

AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE

ARBEITSGRUPPE KLINISCHE IMMUNOLOGIE &

CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG UND ZELLANALYSE

LEITUNG: PROF. DR. RER. NAT. B. MÜLLER-HILKE, MME

**EINFLUSS EINER ANTIBIOTIKAASSOZIIERTEN  
*CLOSTRIDIODES DIFFICILE*-INFEKTION AUF DIE  
KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS IM MAUSMODELL**

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

**DOKTOR DER MEDIZIN**

DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON:

KATHARINA SIGLINDE FRANZISKA WENNDORF, GEB. ZOLLNER

GEB. AM 01.02.1992 IN WÜRZBURG

BERLIN, DEN 30.11.2020

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003287](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003287)

---

Veröffentlichung der Dissertation:

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock in folgender Publikation veröffentlicht:

Schmidt CJ\*, **Wenndorf K\***, Ebbers M, Volzke J, Müller M, Strübing J et al. Infection With Clostridioides difficile Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. Frontiers in Immunology 2020; 11:571049.

\*Erstautorenschaft

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, MME  
AG Klinische Immunologie, Institut für Immunologie  
Universitätsmedizin Rostock

PD Dr. rer. nat. Tomas Fiedler  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner  
Abteilung für Rheumatologie und Klinische Immunologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Datum der Abgabe: 30.11.2020

Datum der Verteidigung: 06.07.2021

---

---

*Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

---

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

---

<b>I.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
2.1	Rheumatoide Arthritis .....	2
2.2	Infektion mit <i>Clostridioides difficile</i> .....	4
2.3	Zielsetzung und Tiermodelle dieser Studie .....	7
<b>III.</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>9</b>
3.1	Verbrauchsmaterialien .....	9
3.2	Chemikalien .....	10
3.3	Versuchstiere .....	10
3.4	Geräte .....	11
3.5	Software.....	11
<b>IV.</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>12</b>
4.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	12
4.2	Bakterienzucht und -aufbereitung.....	13
4.3	Antibiotikavorbehandlung .....	14
4.3.1	Herstellung der Antibiotikaaliquote und Trinkwassergemische .....	14
4.3.2	Vorbehandlung .....	14
4.4	Infektion mit <i>C. difficile</i> .....	15
4.5	Scoring und Behandlung der <i>C. difficile</i> Infektion .....	16
4.6	DNA-Extraktion aus Stuhlproben der Mäuse .....	17
4.7	Nachweis der <i>C. difficile</i> Infektion.....	18
4.7.1	RIDA®QUICK <i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B .....	18
4.7.2	PCR-Nachweis des <i>C. difficile</i> Toxin A-Gens.....	19
4.8	Induktion der kollagen-induzierten Arthritis .....	20

---

4.9	Verlaufskontrolle der kollagen-induzierten Arthritis .....	21
4.10	Kontrolle des Körpergewichts .....	22
4.11	Anästhesie der Tiere .....	22
4.12	Histologische Aufarbeitung .....	22
4.13	Blutanalysen.....	23
4.13.1	Antikörper gegen <i>C. difficile</i> .....	24
4.13.2	Murine und bovine Antikörper gegen Kollagen Typ II.....	24
4.13.3	Inflammatorische Zytokine .....	24
4.14	Mikrobiomanalysen .....	25
4.14.1	DNA-Konzentrationsbestimmung und -Anpassung .....	25
4.14.2	16SrRNA PCR.....	25
4.14.3	Sequenzdatenanalyse .....	26
4.15	Statistische Analyse .....	26
<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
5.1	DBA1 x B10.Q F1-Mäuse sind anfällig für eine Infektion mit <i>C. difficile</i> und Gewichtsverlust korreliert mit Pathogenität verabreichter <i>C. diff.</i> -Stämme.....	27
5.2	Vergleich der Antikörperbildung gegen <i>C. difficile</i> Toxin A und B nach Infektion mit unterschiedlichen <i>C. difficile</i> -Stämmen.....	31
5.3	Bestätigung der <i>C. difficile</i> Infektion mit RIDAQUICK und Toxin-PCR im Stuhl .....	32
5.4	Histologische Auswertung des Darms .....	34
5.5	Quantifizierung der kollagen-induzierten Arthritis .....	36
5.6	Mikrobiomanalysen .....	40
5.7	Analyse der Antikörper gegen <i>C. difficile</i> Toxin A und B am Versuchsende.....	43
5.8	Analyse der Antikörper gegen bovines und murines Kollagen Typ II .....	44
5.9	Analyse der inflammatorischen Zytokine .....	45
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
<b>VII.</b>	<b>FAZIT .....</b>	<b>54</b>

<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>IX. TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
<b>X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>65</b>
<b>XI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>66</b>
<b>XII. THESEN.....</b>	<b>69</b>
<b>XIII. EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>XIV. LEBENSLAUF .....</b>	<b>71</b>
<b>XV. DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>

## I. ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Rheumatoide Arthritis ist eine inflammatorische Autoimmunerkrankung, die chronisch voranschreitet. Sie betrifft in erster Linie die Gelenke und führt durch Schmerzen und Funktionseinschränkungen zu einem Verlust an Lebensqualität. Da es sich um eine Systemerkrankung handelt, kann es auch zu extraartikulären Manifestationen kommen. Die Ätiopathogenese ist multifaktoriell und noch zu einem großen Teil ungeklärt. Unter den Umweltfaktoren gewinnen Schleimhautinfektionen und die induzierenden Pathobionten zunehmend an Aufmerksamkeit. Das anerobe sporenbildende Bakterium *Clostridioides difficile* ist bedeutendster Erreger nosokomialer Diarrhöen, der sich durch Störungen der Darmflora, bspw. durch Antibiotikagaben ansiedelt und krankheitsauslösende Toxine produziert. Da der Fokus in dieser Arbeit auf der Darm-Gelenk-Achse liegt, wird der Einfluss einer Infektion mit *C. difficile* (CDI) auf eine nachfolgende kollagen-induzierte Arthritis (CIA) untersucht.

Ziel dieser Studie war es zunächst, ein reproduzierbares Modell für beide Erkrankungen zu etablieren. Hierzu wurde die Empfänglichkeit der DBA/1J x B10.Q F1-Maus für eine Infektion mit *C. difficile* untersucht. Nach einer Antibiotikavorbehandlung führte die Verabreichung von  $10^5$  koloniebildenden Einheiten (KBE) VPI 10463 mittels Schlundsonde zu Durchfall, signifikantem Gewichtsverlust und einer histologisch nachweisbaren Entzündung im Darm, wohingegen die Verabreichung der weniger pathogenen Stämmen 630, BI17 und 2K14 zu keinem signifikanten Gewichtsverlust führte. Die Bildung und Höhe der Antikörper gegen *C. difficile* Toxine A und B zeigten sich unabhängig von der Pathogenität der verwendeten Clostridienstämme. Sowohl die Inzidenz als auch die Schwere der kollageninduzierten Arthritis wurde durch die vorhergehende CDI durch VPI 10463 stark abgeschwächt. Eine alleinige Antibiotikavorbehandlung ohne nachfolgende CDI hingegen führte in der Kontrollgruppe zu einer Verstärkung der Inzidenz und Schwere der CIA. Weiterhin zeigte sich die Bildung von Antikörpern gegen Kollagen Typ II bei immunisierten Mäusen unabhängig von einer vorherigen CDI. Mikrobiomanalysen aus extrahierter DNA von gesammelten Stuhlproben während des Experiments ergaben eine schnellere Rückkehr zum ursprünglich Mikrobiom nach CDI. Bei einer alleinigen Antibiotikavorbehandlung konnte ein vermehrtes und verlängertes Auftreten von *Enterokokken* im Mikrobiom nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrische Analyse inflammatorischer Zytokine am Ende des Versuchszeitraums ließ keinen Rückschluss auf eine bakterieninduzierte Veränderung der murinen Immunantwort zu.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine durch *C. difficile* VPI 10463 ausgelöste Colitis vor der späteren Entwicklung einer kollagen-induzierten Arthritis bei Mäusen schützte. Sowohl mikrobielle Veränderungen im Darm als auch die Mobilisierung und/oder Polarisierung von Immunzellen könnten zum Schutz vor Arthritis beigetragen haben. Die Aussicht auf mögliche therapeutische Vorteile hieraus, erfordert eine weitere Aufklärung der genauen Mechanismen.

---

## II. EINLEITUNG

---

### 2.1 RHEUMATOIDE ARTHRITIS

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten chronischen entzündlichen Autoimmunerkrankungen [1]. Die Immunantwort richtet sich hierbei vor allem gegen die eigenen Gelenke [2]. Die chronische Entzündung der Gelenkinnenhäute führt zu Schwellung, Rötung und Schmerzen, und durch die Entwicklung von Pannusgewebe werden der Gelenkknorpel und subchondrale Knochen zerstört [3]. Neben dem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke kann es bei der RA als Systemerkrankung auch zu extraartikulären Manifestationen [4] vorwiegend an Blutgefäßen, der Lunge, den Augen, aber auch dem Magen-Darm-Trakt, den Nieren und dem Nervensystem kommen [1, 5]. Ohne eine adäquate Therapie führt die chronische Entzündung zu starken Schmerzen, Fehlstellungen und Funktionsstörungen, die mit einem Verlust an Lebensqualität und im fortgeschrittenen Stadium auch mit Einschränkungen in der Selbstversorgung einhergehen [2]. Die Erkrankung beginnt typischerweise im fünften bis achten Lebensjahrzehnt, wobei das mittlere Erkrankungsalter zwischen 55 und 65 Jahren liegt und die Inzidenz mit zunehmendem Alter ansteigt [6–8]. Frauen sind durchschnittlich früher und dreimal häufiger betroffen als Männer [9, 10]. Mit einer weltweiten Prävalenz von etwa 1 % und einer jährlichen wirtschaftlichen Belastung von etwa 45 Milliarden Euro in Europa ist die RA auch von hoher sozioökonomischer Relevanz [11, 12].

Eine zeitige medikamentöse Therapie gilt heute als der „Goldstandard“, um Gelenkerosionen und damit verbundene irreversible Spätschäden bereits im Frühstadium zu vermeiden [13–15]. Absolute Voraussetzung dafür ist jedoch die sichere und eindeutige Diagnosestellung. Mit der Identifizierung von Autoantikörpern gegen citrullinierte Peptidantigene (ACPA) ist in diesem Rahmen bei der rheumatoiden Arthritis neben dem Nachweis des Rheumafaktors vor wenigen Jahren ein Durchbruch gelungen [16, 17]. Diese Antikörper sind bereits im Frühstadium bei bis zu 80 %, der Rheumafaktor hingegen bei nur 60 - 70 % der Patienten im Serum nachweisbar [18, 19]. Außerdem sind sie spezifischer für die rheumatoide Arthritis als der Rheumafaktor und lassen ebenso auf einen schwereren und erosiven Verlauf schließen [20, 21]. Ein Nachweis dieser Antikörper bis zu 14 Jahre vor Ausbruch der ersten Krankheitssymptome deutet auf eine Beteiligung der ACPA bei der Pathogenese hin, was für einen anderen Induktionsort der Autoimmunität als die Gelenke spricht [22]. Die Diagnosestellung basiert auf den EULAR Klassifikationskriterien, bei der für die Anzahl der betroffenen Gelenke, dem serologischen Antikörpernachweis (seropositive RA), sowie Entzündungsparametern und der Dauer der Symptomatik ein Punktwert vergeben wird [17].



Ab einem Mindestwert von sechs Punkten und einer mindestens an einem Gelenk nachgewiesenen Synovitis gilt die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis als gesichert [17].

Das Therapiekonzept in der Rheumatologie basiert auf dem Grundsatz „hit hard and early“, da die ersten Monate der Erkrankung ein „therapeutisches Fenster“ darstellen, innerhalb dessen der immunologische Prozess nachhaltig verändert oder sogar beendet werden kann [14, 23]. Um bestenfalls eine Remission zu erreichen, sollte möglichst bald nach Symptombeginn die Behandlung mit Basistherapeutika, den sogenannten Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) eingeleitet werden [24, 25, 23]. Bekanntester Vertreter dieser Immunsuppressiva und Mittel der Wahl ist Methotrexat (MTX), gefolgt von Reservemitteln wie Leflunomid oder Sulfasalazin [26]. Diese verringern oder beseitigen nachweislich die entzündliche Aktivität, die Gelenkzerstörung wird aufgehalten und somit die Lebensqualität nachhaltig verbessert [27]. Begleitend wird eine Therapie mit Steroiden empfohlen [25]. Seit einigen Jahren stehen außerdem sogenannte Biologicals zur Verfügung, die zentral in den Entzündungsprozess eingreifen und bei therapierefraktären und stark betroffenen Patienten eine neue Chance darstellen [24]. Zu diesen Medikamenten gehören die TNFalpha Inhibitoren, wie Adalimumab, Infliximab und Etanercept, sowie weitere Vertreter wie Rituximab (Anti-CD20), Abatacept (zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4-Immunglobulin) und Tocilizumab (Anti-Interleukin-6-Rezeptor) [27, 28]. Die Nachteile bestehen allerdings in sehr hohen Therapiekosten, einer notwendigen Dauertherapie und nicht ausreichend bekannten Langzeitwirkungen [29]. Obwohl in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Verbesserung der Frühdiagnose und die Entwicklung zahlreicher wirksamer Medikamente zu beobachten war, gibt es bis heute weder eine Heilung noch ist die Pathogenese der RA vollständig aufgeklärt.

Oberste Priorität für eine effektive Prophylaxe ist die Erforschung und damit das Verständnis des auslösenden Mechanismus, wodurch in der Vergangenheit schon diverse Risikofaktoren für die Entwicklung der Erkrankung ausgemacht werden konnten [30]. Die RA gilt als multifaktorielle Erkrankung und der Anteil des durch genetische Faktoren erklärten Krankheitsgeschehens wurde auf 53 bis 65 % geschätzt [31]. Der größte bisher bekannte genetische Risikofaktor ist das Humane Leukozyten Antigen (HLA)-Antigen DRB1 [32, 22]. Auf diesen Allelen kodiert eine spezifische Aminosäuresequenz für die „Shared Epitope“, welche die Entstehung einer seropositiven Arthritis und somit eine schwerere Verlaufsform begünstigen [22]. Neben Geschlecht und Alter lassen sich ungefähr die Hälfte der Risikofaktoren für eine RA auf umweltbedingte Faktoren, wie Lebensstil, Ernährung und Infektion zurückführen [31, 33]. Beispielsweise gilt das Rauchen als einer der wichtigsten Einflussfaktoren für die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis [34]. Das Erkrankungsrisiko ist bei Rauchern etwa doppelt so hoch wie bei Nichtrauchern, wobei es außerdem einen Zusammenhang zwischen der Menge der konsumierten Zigaretten und dem Erkrankungsrisiko

für RA zu geben scheint [35, 36]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter BMI mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für rheumatoide Arthritis einhergeht [37]. Laut früheren Statistiken werden mehr als 60 % der Patienten mit RA anhand des Body-Mass-Index ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) als übergewichtig oder adipös eingestuft [38, 39]. Zusätzlich erleiden an RA erkrankte adipöse Patienten einen deutlich schwereren Verlauf als normalgewichtige Patienten [40].

Die Suche nach einem infektiösen Mikroorganismus, der die Pathogenität der RA auslöst, war das Ziel umfangreicher Studien. Da sich keine zeitlichen und örtlichen Häufungen der Prävalenzen der RA zeigen und eine Verzögerung zwischen Infektion und Krankheitsausbruch wahrscheinlich ist, gestaltet sich die Suche nach einem auslösenden Mikroorganismus schwierig [41]. Zu den frühen Mikroorganismen, die im Verdacht standen, bei der Pathogenese der RA eine Rolle zu spielen, gehörten *Epstein-Barr* und das *humane Parvovirus* [42]. In jüngerer Zeit haben Bakterien wie *Proteus mirabilis*, *Escheria coli ssp*, *Klebsiella pneumoniae* und *Porphyromonas gingivalis* zunehmend an Interesse gewonnen [43–45]. Diese Bakterien induzieren mukosale Immunreaktionen im Harntrakt, im Darm und in der Lunge bzw. im Zahnhalteapparat. Die beteiligten ätiologischen Modelle implizieren dort Gewebestress, die Bildung von Neo-Autoantigenen, den Verlust der Toleranz durch molekulares Mimikry zwischen mikrobiellen T-Zell-Epitopen und Wirtsepitopen und somit eine abnormale Aktivierung des Immunsystems und schließlich einen Übergang der Immunreaktion auf die Gelenke [46]. Da nicht nur die Ernährung, sondern auch eine Dysbiose des Darms, beispielsweise infolge von Antibiotikagabe oder einer Infektion, und die darauffolgende abweichende Immunantwort häufig mit der RA in Verbindung gebracht wurden, gewinnt die Magen-Darm-Schleimhaut als Ort der RA-Induktion zunehmend an Aufmerksamkeit [47–50].

## **2.2    INFEKTION MIT *CLOSTRIDIODES DIFFICILE***

*Clostridioides difficile* (*C. difficile*) hat sich in den letzten Jahren als bedeutendster Erreger nosokomialer Diarrhöen etabliert, welche an fünfter Stelle der häufigsten Hospitalinfektionen rangiert [51, 52]. Es handelt sich um ein grampositives, anaerobes Bakterium, das die Fähigkeit zur Bildung aerotoleranter Sporen besitzt. Aufgrund dieser Eigenschaft weist *C. difficile* eine große Resistenz gegenüber üblichen Desinfektionsmaßnahmen auf, wodurch ihm das Überleben in der Krankenhausumgebung erleichtert wird, was zu einer hohen Prävalenz des Erregers in Krankenhäusern und Pflegeheimen führt [53]. Reservoir für den Erreger ist die Umwelt, wobei das Bakterium ubiquitär, z.B. im Boden oder Oberflächenwasser, sowie im Darmtrakt von Mensch und Tier vorkommen kann [54]. Die Übertragung findet über fäkal-orale Wege statt [55]. Ausgelöst wird die Krankheit durch die Virulenzfaktoren

---

Enterotoxin A und Cytotoxin B, die nach der Besiedlung des Magen-Darm-Trakts von *C. difficile* gebildet werden, wofür meist eine Störung der Darmflora ursächlich ist [56]. Toxin A verursacht durch Interaktion mit uminalen Epithelzellen Gewebeschäden und Ödeme und erleichtert somit Toxin B die Migration in die Lamina propria, wo multiple Immunreaktionsmechanismen ausgelöst werden [56, 57].

Das Krankheitsbild einer Infektion mit *C. difficile* (CDI) kann verschiedene Ausmaße annehmen, abhängig von der Pathogenität des Clostridienstammes und disponierenden Faktoren auf Seiten des Wirts. Die klinischen Manifestationen reichen von einem asymptomatischen Verlauf, einer milden, selbstlimitierenden Diarrhö bis hin zu einer fulminanten Kolitis, begleitet von Komplikationen wie toxischem Megakolon, Darmperforation und/oder Sepsis bis hin zum Tod [58]. Die Letalität wird mit 1 - 2 % angegeben - bei älteren Patienten mit Komorbiditäten und insbesondere in Verbindung mit dem gehäuften Auftreten von hypervirulenten Stämmen ist sie jedoch deutlich höher [59, 60]. Der häufigste Grund für eine Störung der Darmflora heutzutage ist die Anwendung von Antibiotika, wobei der globale Antibiotikaverbrauch zwischen 2000 und 2015 um 65 % gestiegen ist [61]. Diese Erkenntnisse gepaart mit klassischen Risikofaktoren für Krankenhausinfektionen wie hohes Alter (>65 Jahre), gastrointestinale Grundkrankheiten, langer Krankenhausaufenthalt und Immunsuppression erhöhen das Risiko, an einer CDI zu erkranken, drastisch [61, 62]. Weitere spezifische Risikofaktoren für eine CDI sind eine schon stattgehabte CDI, frühere Krankenhausaufenthalte und neben Antibiotikagaben die Behandlung mit diversen pharmakologischen Wirkstoffen wie Proteinpumpeninhibitoren, Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten, Glukokortikoiden und Chemotherapeutika [63]. Bei den Antibiotika treten Infektionen hauptsächlich nach Behandlungen mit Cephalosporinen, Penicillinen, Clindamycin oder Cotrimoxazol auf, wobei Patienten, die mehr als eine Klasse von Antibiotika erhalten, danach mit größerer Wahrscheinlichkeit eine *C. difficile*-assoziierte Diarrhöe erleiden [64–67]. Neueren Beobachtungen zufolge kann der *C. difficile* Infektion eine Therapie mit fast jedem Antibiotikum vorausgegangen sein [59]. Für Patienten, die nichtsteroidale Entzündungshemmer einnehmen, wurde ein um 30 % häufigeres Auftreten von *C. difficile* Infektionen beschrieben [68]. Bemerkenswert ist, dass 50 - 70 % der gesunden Bevölkerung Antikörper gegen Toxine aufweisen und damit den früheren Kontakt mit dem Bakterium dokumentieren [69–71].

Etwa 15 - 20 % der Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen und über 95 % der Fälle von pseudomembranöser Kolitis werden von *C. difficile* verursacht [72]. Bei ca. 1 % der antibiotisch behandelten Patienten muss mit einer *C. difficile*-Infektion gerechnet werden. Außerhalb der Krankenhäuser ist diese jedoch deutlich seltener. Vermutliche Ursachen für diesen Unterschied sind der vermehrte Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika, die längere

Zeitdauer der antibiotischen Therapie und der kombinierte Einsatz mehrerer Antibiotika im Krankenhaus, verglichen zum ambulanten Bereich [73, 74]. In jüngerer Zeit wurde jedoch auch über das Auftreten ambulant erworbener *C. difficile* Infektionen bei jungen gesunden Patienten ohne offensichtliche Risikofaktoren berichtet [75]. Von Bedeutung ist auch der immunologische Status wie z.B. das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen Enterotoxine [70]. *C. difficile* wird bei bis zu 20 % der hospitalisierten Patienten und bei 25 – 80 % gesunder Neugeborener und Säuglinge gefunden [76]. Die Kolonisierungsraten der gesunden Erwachsenen, den sogenannten symptomlosen Trägern, bewegen sich zwischen 0,8 % und 13 % [69]. Nur ein Bruchteil der kolonisierten Patienten entwickelt jedoch eine nachweisbare Infektion [77, 78]. Seit dem Jahr 2003 wird weltweit nicht nur über eine Zunahme der Inzidenz der *C. difficile*-Infektionen, sondern auch der Schwere der Erkrankungen berichtet [79, 59]. In Deutschland ergab eine Analyse der Entlassungsdiagnosen der Jahre 2000 - 2004 einen deutlichen Anstieg der *C. difficile*-Infektionen von 7 auf 39 Fälle pro 100.000 stationärer Patienten, zwischen den Jahren 2004 und 2006 kam es noch einmal zu einer Verdoppelung [76, 80]. Dieser Trend zeigt den Bedarf an schneller Diagnostik und anschließend wirksamer Therapie, sowie die Reduzierung unnötiger antimikrobieller Therapien und die Umsetzung derzeit empfohlener Maßnahmen zur Infektionskontrolle [80].

Die Diagnose einer *Clostridioides-difficile*-Infektion kann sich als herausfordernd darstellen, basiert aber grundlegend auf klinischen Zeichen wie der Diarrhö (> 3x flüssiger Stuhl am Tag) [81]. Als Goldstandard des Labornachweises werden der Zellzytotoxizitätsneutralisationstest (CCNA) und die toxigene Kultur (TC) angesehen. Für den CDI-Nachweis stehen außerdem mehrere Schnelltests zur Verfügung, wie beispielsweise Enzymimmunoassays für Toxine A/B und Nukleinsäure-Amplifikationstests zum Nachweis von Toxin-Genen. Jedoch weisen alle der genannten Methoden Einschränkungen auf, weshalb mehrstufige algorithmische Tests in internationalen Richtlinien empfohlen werden. Trotz dieser Empfehlungen weichen die Testmethoden der Krankenhäuser stark voneinander ab [82].

Der erste Schritt der Behandlung einer CDI besteht darin, das initial Diarrhö verursachende Antibiotikum abzusetzen [78]. Als Goldstandard der CDI-Therapie haben sich orales Vancomycin oder Fidaxomicin bewährt, die nachweisliche höhere Heilungsraten aufweisen als das frühere Mittel der Wahl Metronidazol [63]. Bei mehr als zwei Rezidiven trotz Antibiotikabehandlung wird eine fäkale Mikrobiota-Transplantation empfohlen (FMT) [83, 84].

Eine breite Antibiotikagabe, sowie eine Infektion mit *C. difficile* und deren Therapie sorgen für eine massive Störung der Darmflora. Da diese eng mit dem mukosalen Immunsystem verknüpft ist und in der Vergangenheit bereits Zusammenhänge zwischen dem Mikrobiom und einer rheumatoider Arthritis festgestellt wurden [85], ist es von großem Interesse herauszufinden, ob eine CDI ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung einer RA haben könnte.

### 2.3 ZIELSETZUNG UND TIERMODELLE DIESER STUDIE

Mit dem vorliegenden Versuchsvorhaben wurde ein möglicher Zusammenhang einer weit verbreiteten Infektion mit dem Bakterium *Clostridium difficile* und der „Volkskrankheit“ rheumatoide Arthritis untersucht. Hintergrund dieser Studie ist die Tatsache, dass das mukosale Darmmikrobiom in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis gerückt ist [48]. Es hat sich herausgestellt, dass sowohl orale, als auch im Darm lebende oder dort pathogene Mikroorganismen den Ausbruch und die Schwere der Erkrankung beeinflussen [43–45]. Da beide Erkrankungen in unterschiedlichen Kompartimenten des Organismus ablaufen und sich dort möglicherweise gegenseitig beeinflussen, lässt sich dieses Vorhaben nur am lebenden Tier untersuchen. Es gibt keine Zell- oder Organkultur, die eine derart komplexe Situation nachstellen könnte. In diesem Experiment wird mit einem Mausmodell gearbeitet, da die Mikrobiome von Menschen und Mäusen große Gemeinsamkeiten aufweisen [86, 87]. Zur Erforschung der rheumatoiden Arthritis hat sich in den letzten Jahren die kollagen-induzierte Arthritis (CIA) als das am häufigsten untersuchte Modell herausgestellt [20, 88, 89]. Es hat mehrere pathologische Merkmale mit der RA gemeinsam, wobei es hauptsächlich durch eine aufgehobene Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen zu einem Angriff des Immunsystems auf die Gelenke kommt [89, 90]. Das CIA-Modell wurde ausgiebig genutzt, um potenzielle pathogene Mechanismen der Autoimmunität zu identifizieren, einschließlich der Rolle einzelner Zelltypen bei Krankheitsbeginn und -fortschritt, sowie um neue Therapeutika zu entwickeln und zu testen [91]. Außerdem hat sie von den antigendefinierten Modellen, die auf Knorpelproteinen basieren, die kürzeste Zeitspanne zwischen Immunisierung und Krankheitsmanifestation. Zu Beginn der Experimente wurden drei Hypothesen aufgestellt, die im Weiteren genauer dargestellt werden.

Die erste Hypothese dieses Versuchs basiert auf der Annahme, dass die Anfälligkeit für eine CDI vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig ist. In der Literatur wurde die Suszeptibilität von Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen auf eine CDI unterschiedlich beschrieben [92]. Da in diesem Versuch die Verwendung der DBA/1J x B10.Q F1 Maus aufgrund guter Ergebnisse in der Rheumaforschung in der Arbeitsgruppe der klinischen Immunologie der Universität Rostock favorisiert wurde [88, 93], erfolgte als erstes die Überprüfung von vier humanpathogenen *C. difficile* Stämmen auf ihre Pathogenität in der F1 Maus. Ziel war es hierbei, ein Modell für die CDI zu entwickeln, das zuverlässig in Kombination mit der CIA reproduzierbar ist. Hierfür wurde zunächst durch eine dreitägige breite Antibiotikagabe im Trinkwasser, sowie einer einmaligen intraperitonealen Injektion von

Clindamycin die mikrobielle Darmflora zerstört um nachfolgend eine Infektion mit *C. difficile* zu begünstigen, wobei grob dem Protokoll von Chen et. al gefolgt wurde [92]. Die erfolgte Infektion mit *C. difficile* wurde am lebenden Tier über die Entwicklung einer Diarrhö und dem damit einhergehenden Gewichtsverlust überprüft. Die F1 Maus zeigte sich anfällig für eine CDI, sodass die Weiterführung der Experimente mit diesem Mausstamm möglich war.

Nach der Etablierung der CDI in der F1 Maus und der Identifizierung eines passenden Clostridienstammes, sowie dessen Verabreichungsmenge, wurde die zweite Hypothese auf Richtigkeit bzw. Standfestigkeit geprüft: die prophezeite Verstärkung einer kollagen-induzierten Arthritis durch eine vorherige antibiotikaassoziierte Infektion mit *C. difficile*.

Nach Abklingen der Clostridieninfektion, entsprechender Therapie und vollständiger Genesung der Tiere wie oben beschrieben, wurde eine Kollagen Typ II induzierte Arthritis ausgelöst und die Ausprägung der Arthritis dieser Mäusegruppe mit drei Kontrollgruppen verglichen. Bei diesen wurde entweder nur eine CDI oder nur eine CIA ohne vorherige Infektion induziert, oder sie erhielten nur die Antibiotikavorbehandlung mit anschließender Placebo- statt Bakteriengabe. *Post mortem* wurden im Serum der Tiere Antikörper gegen *C. difficile* bzw. entsprechende Toxine quantifiziert, sowie exemplarisch der histologische Nachweis der Infektion am Darm durchgeführt. Die Ausprägung und der Schweregrad der Arthritis wurde am lebenden Tier makroskopisch bestimmt, sowie *post mortem* die serologische Analyse der Antikörper gegen murines und bovines Kollagen sowie die Zytokine analysiert.

Die dritte Hypothese lautete: Hat das sich verändernde Mikrobiom einen Einfluss auf die Arthritis bzw. die Arthritis auf das Mikrobiom? Zur Überprüfung wurden zu fünf Zeitpunkten während des Experiments Stuhlproben gesammelt und anschließend deren mikrobiotische Zusammensetzung analysiert.

Im Folgenden sind die Hypothesen dieser Arbeit noch einmal zusammengefasst:

1. Die DBA1/B10.Q F1 Maus ist nach Antibiotikavorbehandlung empfänglich für eine Infektion mit *C. difficile*, wobei die Ausprägung der klinischen Symptome von der Pathogenität des verwendeten Clostridienstammes abhängig ist.
2. Eine vorhergehende Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 führt zu einer Verstärkung der kollagen-induzierten Arthritis.
3. Die Antibiotikabehandlung und Infektion mit *C. difficile* induzieren eine Veränderung im Mikrobiom, die sich im Weiteren auf die CIA auswirkt.

### III. MATERIAL

#### 3.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Produktbeschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Omnifix-F Spritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 9161406V
Omnifix Luer Lock Spritze 5 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 4617053V
Microlance 3 26G ½"	Becton, Dickinson and Comp.	REF 303800
Microlance 3 25G 1"	Becton, Dickinson and Comp.	REF 300400
M. tuberculosis des. H37 Ra 100 mg	Becton, Dickinson and Comp.	231141
TMB Substrate	BioLegend	421101
Legendplex Mouse Inflammation Panel	BioLegend	740446
Rabbit anti-mouse IgG	Bio-Rad Laboratories, Inc.	STAR13B
hemoCARE Guajak-Teststreifen	Care Diagnostica-Labor Deutschland	PZN 07152262
Multi-SafeSeal-Tubes 1,7 ml	Carl Roth GmbH und Co. KG	167666071
Feeding Needle 20G	Fine Science Tools	18060-20
Spritzenfilter 0,45 µm	Integra Biosciences GmbH	153015
Einbettkassette Standard	Kabe Labortechnik GmbH	REF 053749
Cellsafe Biopsy Capsule	Leica Biosystems Nussloch GmbH	LOT 03701417
Graduated Pipette Tips 20 µl	nerbe plus GmbH	07-372-2015
Graduated Pipette Tips 200 µl	nerbe plus GmbH	07-376-2015
Graduated Pipette Tips 1000 µl	nerbe plus GmbH	07-693-8300
Einmalhandschuhe Gr. S	Paul Hartmann AG	REF 942196
RIDA QUICK Clostridium Toxin A/B	r-biopharm	N0803
Deckgläser 24 x 50 mm	Roth	1871.2
Objektträger	Roth	PC68.1
Deckgläser 24 x 50 mm	Roth	PC67.1
End-to-End Kapillare 20 µl	Sarstedt AG & Co.	REF 19.447
Greiner Falcon Tube 16 C 15 ml	Sigma-Aldrich	T1943 SIGMA
Greiner Falcon Tube 16 C 50 ml	Sigma-Aldrich	T2318 SIGMA
Clostridium difficile Toxin B-Antibodies	Tgc biomics	TGC-E102-1/mouse
Clostridium difficile Toxin A -Antibodies	Tgc biomics	TGC-E101-1/mouse
Medisorb 96-well plates	Thermo Fisher Scientific	467320
Medisorb 96-well plates	Thermo Fisher Scientific	442404
DNA Miniprep Kit	Zymo Research	ZRC200676

### 3.2 CHEMIKALIEN

Produktbeschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Ethanol 70 %	Apomix / PKH Halle GmbH	PZN 0005316
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG	PZN 04454815
Metronidazol	B. Braun Melsungen AG	PZN 05543515
Rompun 2 %	Bayer AG	82826107
Incomplete Freud Adjuvant 10 ml	Becton, Dickinson and Comp.	263910
Esketamin 10 %	bela-pharm GmbH & Co. KG	9089.01.00
Formafix 4 %	Grimm MED Logistik GmbH	F10010G
Dismozon plus	Bode Chemie GmbH	PZN 09423506
Colistiflex 1 mio. I.E.	InfectoPharm	PZN 11511790
Bovines Kollagen Typ II 10 mg	MD Bioproducts	804001-Lyo
Usedecalc	MEDITE GmbH	REF 40-3310-00
Vanco-saar mycin 500 mg	MiP	PZN-03796531
Clinda-saar 600 mg	MiP	PZN-03796519
Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH	H00208-0830
Tramadol 100 mg/ml	Ratiopharm	6181089
Gentamicin 40 mg/ml	Ratiopharm	03928174
Kanamycinsulfat > 750 I.U./mg	Carl Roth	T832.1
RNA later	Sigma-Aldrich	R0901
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A9418
BupH Modified Dulbecco's	Thermo Fisher Scientific	28374
Betamercaptoethanol	UMR Zentralapotheke	
Novaminsulfon 500mg	Zentiva	PZN 03507946

### 3.3 VERSUCHSTIERE

Mausstamm	Geschlecht	Alter zu Beginn	Anzahl (n)
F1 (DBA/1J x B10.Q)	Männlich	8-12 Wochen	67
F1 (DBA/1J x B10.Q)	Weiblich	8-12 Wochen	2



### 3.4 GERÄTE

Produktbeschreibung	Hersteller
HT3 Plattenphotometer	Anthos Mikrosysteme GmbH
FACSCalibur Becton	Becton, Dickinson and Company
Axioskop 40 Mikroskop	Carl Zeiss AG
AxioCam MRc 5 Kamerakopf	Carl Zeiss AG
Hyrax M 55 Mikrotom	Carl Zeiss AG
Multipette plus	Eppendorf AG
Centrifuge 5418R	Eppendorf AG
Thermomix comfort	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 100 µl Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 250 µl Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 1000µl Pipette	Eppendorf AG
Pipetboy acu	IBS Integra biosciences
Fastprep24	MP Biomedicals
Magnetrührer R3T	Mwl projects gmbh
Sartorius handy Digitalwaage	Sartorius AG
Vortex IKA MS1 Minishaker	Sigma-Aldrich
Precellys 24 Homogenizer	Stretton Scientific Ltd
Nanodrop 2000 Spektralphotometer	ThermoFischer Scientific

### 3.5 SOFTWARE

Produktbeschreibung	Hersteller	Verwendungszweck
AxioVision Rel Version 4.8	Carl Zeiss AG	Anfertigung der histologischen Bilder
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc	Abbildungen und Statistik
SPSS Version 22	IBM	Abbildungen und Statistik
Microsoft Excel Version 2016	Microsoft Corporation	Datenarchivierung
Microsoft Power Point Vers. 2016	Microsoft Corporation	Abbildungen
Microsoft Word Version 2016	Microsoft Corporation	Dissertationsschrift
Citavi	Swiss Academic Software	Zitierprogramm

## IV. METHODEN

---

### 4.1 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG

Bei den Mäusen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, handelt es sich um DBA/1J x B10.Q F1 Mäuse. Die DBA/1J Mäuse wurden ursprünglich von Charles River und die B10.Q Mäuse von Jackson Laboratory erworben. Die F1 Generation DBA/1J x B10.Q wurde dann in der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock unter Specific-Pathogen-Free(SPF)-nahen Bedingungen gezüchtet. Noch in der Tierversuchshaltung erhielten die Mäuse eine Markierung am Ohr mittels Lochzange, um eine Unterscheidung der Tiere im Verlauf zu gewährleisten. Anschließend wurden sie in den Infektionstierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock überführt. Nach einer drei bis fünftägigen Akklimatisierungszeit in der neuen Umgebung wurden die Mäuse mit einem Alter von 8-12 Wochen [92] in die Experimentengruppen aufgenommen. Die Mäuse wurden allein oder maximal zu fünf im Käfig gehalten. Sie wurden einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden in einer klimakontrollierten Umgebung mit einer Temperatur im Infektionstierstall von  $25 \pm 5$  °C bei einer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5\%$  ausgesetzt. Die Tierhaltung erfolgte in speziellen Käfigen, die jeweils separat durch eine Lüftungsanlage mit gefilterter Luft belüftet wurden, um eine Kreuzkolonisierung mit anderen Bakterien während der Versuche zu vermeiden. Je nach Verschmutzungsgrad und Anzahl der Mäuse pro Käfig erfolgte die Reinigung der Käfige jede oder jede zweite Woche, wobei sowohl die Käfige als auch das Streu, Futter und Wasser komplett gewechselt wurden. Als Trinkwasser diente Leitungswasser und als Futter Standardfutter, wobei den Mäusen der Zugang zu beidem *ad libitum* gewährt wurde. Der Trinkwasser- und Futterwechsel erfolgte nach Bedarf, mindestens aber zu den regulären Käfigwechseln. Im Verlauf der Experimente wurden die Tiere regelmäßig gewogen, je nach Experimentphase jeden, jeden zweiten oder jeden dritten Tag. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von Esketamin und Xylazin in tiefe Narkose versetzt und nachfolgend durch eine zervikale Dislokation getötet. Die durchgeführten Versuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern ([www.lallf.de](http://www.lallf.de)) mit dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-035-16 genehmigt und gemäß gängigen Richtlinien und Gesetzen für Tierversuche durchgeführt.

## 4.2 BAKTERIENZUCHT UND -AUFBEREITUNG

Die Bakterienzucht und -aufbereitung erfolgte durch das Institut für Mikrobiologie der Universität Rostock mit freundlicher Unterstützung von Dr. Katja Kriebel und Julia Fischer. Die *Clostridioides difficile*-Stämme 630, 2K14, BI175 und VPI 10463 wurden freundlicherweise von Nigel P. Minton, University of Nottingham bereitgestellt. Alle Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen (N<sub>2</sub> mit max. 5% H<sub>2</sub>) mit Brain-Heart-Infusion-Medium (BHIS), das mit 5 g/l Hefeextrakt und 0,1% L-Cystein angereichert wurde, gezüchtet. Die *C. difficile* Stämme 630, 2K14 und BI17 wurden gezüchtet, bis sie die mittlere logarithmische Phase (log) erreichten. Der Zeitpunkt der Zellsammlung war je nach medium- und wachstumsbedingten spezifischen Wachstumsraten  $\mu[h^{-1}]$  und Verdoppelungszeiten  $td[min]$  unterschiedlich. Die Bakterienkulturen wurden zentrifugiert, mit Dulbecco's buffered Saline (DPBS) gewaschen und in 50  $\mu$ l Glycerin in folgenden Mengen resuspendiert, siehe Tabelle 1.

Um eine eventuelle Änderung der Bakteriendosis im Experimentenzeitraum zu erfassen, wurde ein Monitoring der eingefrorenen Bakterien durchgeführt, was ebenfalls das Institut für Mikrobiologie der Universität Rostock übernahm. Hierbei konnten bei den Stämmen 2K14, BI17 und 630 keine Dosisänderungen festgestellt werden. Die Aliquote wurden bis unmittelbar vor den jeweiligen Experimenten bei -80 °C aufbewahrt. Für die Inokulation wurden die Aliquote aufgetaut, gevortexed und dann mit DPBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  koloniebildende Einheiten verdünnt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass das maximale Volumen, das den Tieren laut Herstellerangaben via Schlundsonde verabreicht werden sollte, 200  $\mu$ l nicht überstieg. Der Prozess der Verdünnung sollte möglichst schnell ablaufen, um einen Zellzahlverlust der anaeroben Bakterien durch den Kontakt mit Sauerstoff möglichst gering zu halten. Aufgrund eines hohen KBE-Verlustes beim Einfrieren und Auftauen von *C. difficile* VPI 10463 wurde dieser Stamm für jedes Experiment frisch vorbereitet. *C. difficile* VPI 10463 wurde 24 Stunden kultiviert, in BHIS auf eine optische Dichte von 1,5 eingestellt und in 1 ml Aliquote aliquotiert. Für die KBE-Zählung wurden 100  $\mu$ l verwendet, um eine Serienverdünnung auf BHIS-Agarplatten durchzuführen. Die Platten wurden für weitere 24 Stunden inkubiert und die KBE pro Milliliter berechnet.

Tabelle 1: Übersicht über die Menge der eingefrorenen Bakterienkulturen

Clostridienstamm	Menge
630	$3,68 \times 10^7$ KBE /ml
2K14	$3,17 \times 10^8$ KBE /ml
BI17	$3,57 \times 10^7$ KBE /ml

### 4.3 ANTIBIOTIKAVORBEHANDLUNG

#### 4.3.1 HERSTELLUNG DER ANTIBIOTIKAALIQUEUTE UND TRINKWASSERGEMISCHE

Den Versuchstieren wurde zu Beginn der Versuche drei Tage lang ein Antibiotikagemisch über das Trinkwasser verabreicht. Da sich bei dieser Art der Verabreichung nur bedingt Aussagen über die Stabilität treffen lassen, wurde dieses an jedem der drei Tage frisch zubereitet. Da einige Antibiotika nur in Pulverzustand erhältlich sind und aufgrund des geringen Gewichts der Mäuse nur marginale Mengen benötigt werden, wurden im Voraus Stammlösungen für besagte Antibiotika hergestellt und laut Herstelleranweisung oder Literatur gelagert.

Alle Stammlösungen wurden zum Schutz vor Verunreinigung in einer Sicherheitswerkbank mit sterilisiertem Wasser hergestellt. Für die intraperitoneale Injektion von Clindamycin am sechsten Versuchstag wurde eine Verdünnung mittels PBS hergestellt. Hierzu wurden 0,2 ml Clindamycin aus der Durchstechflasche entnommen und mit 9,8 ml PBS verdünnt. Dadurch ergab sich eine Dosierung von 3 mg/ml, sodass 0,1 ml für eine Maus mit einem Gewicht von 30 g verabreicht werden konnte.

**Tabelle 2: Herstellung der Antibiotikastammlösungen**

Antibiotikum	Kanamycin	Colistin	Vancomycin
Pulver auflösen in:	50 ml H <sub>2</sub> O	10 ml H <sub>2</sub> O	20 ml H <sub>2</sub> O
Aliquotmengen:	1 ml	1 ml	1 ml
Dosierung:	100 mg/ml	100.000 U/ml	25 mg/ml

#### 4.3.2 VORBEHANDLUNG

Für die Vorbehandlung folgten wir einem zuvor beschriebenen Protokoll [92]. Diese erfolgte, um den Clostridien einen Angriffsraum im Darm der Mäuse zu ermöglichen indem mittels der Antibiotikabehandlung die mikrobielle Darmflora zerstört wurde. Hierfür wurde täglich eine Antibiotika-Mischung aus Kanamycin, Gentamicin, Colistin, Metronidazol und Vancomycin in sterilem Wasser hergestellt. Die in Tabelle 3 angegebenen Mengen entsprechen der ungefähren Tagesdosis pro Maus für jedes der Antibiotika. Die Antibiotika-Konzentrationen im Wasser wurden basierend auf dem durchschnittlichen Gewicht und dem erwarteten Wasserverbrauch der Mäuse berechnet; Chen et. Al hat hierbei mit 30g pro Maus und 3 ml

Wasserverbrauch pro Tag gerechnet. Die Mäuse wurden drei Tage lang mit dem Antibiotikagemisch im Trinkwasser vorbehandelt, gefolgt von einer Auswaschung, was eine zweitägige Gabe von normalem Trinkwasser bedeutet und einer intraperitonealen Injektion von 10 mg/kg Clindamycin nach zwei Tagen. Hierfür wurden die Mäuse fixiert und das Antibiotikum wurde mit einer dünnen Nadel vorsichtig in den Intraperitonealraum des rechten unteren Abdomenquadranten appliziert.

**Tabelle 3: Übersicht der im Experiment verwendeten Antibiotika im Trinkwasser**

	Kanamycin	Gentamicin	Colistin	Metronidazol	Vancomycin	Clindamycin
Dosis/ Maus	40 mg/kg,	3,5mg/kg,	4,2 mg/kg	21,5 mg/kg	4,5mg/kg,	10mg/kg
[c] im Trinkwasser	0,4 mg/ml	0,035mg/ml	850 U/ml	0,215mg/ml	0,045mg/ml	3mg/ml

#### 4.4 INFEKTION MIT *C. DIFFICILE*

Einen Tag nach der Clindamycin-Gabe am siebten Versuchstag erhielten die Mäuse entweder 200 µl frisch vorbereitete *C. difficile* VPI 10463 oder die aufgetauten Clostridienstämme *C. difficile* 630, 2K14 oder BI17 in Glycerin und PBS über eine Schlundsonde. Nach entsprechender Aufbereitung der Bakterien wurde die benötigte Menge in eine 1 ml - Spritze aufgezogen, die Schlundsonde aufgesteckt und entlüftet. Anschließend wurden die Mäuse in



**Abbildung 1: Durchführung der Bakterienapplikation mittels Schlundsonde**

aufrechter Position fixiert. Wichtig war hierbei eine Überstreckung des Kopfes zur Begradigung des Speiseröhrenverlaufs. Behutsam wurde die Schlundsonde an der Zunge vorbei möglichst senkrecht über die Speiseröhre bis zum Mageneingang geschoben. Die Maus sollte während der langsamen Applikation genau beobachtet werden, um bei Aspirationsanzeichen sofort abbrechen zu können. Die Infektionen mit *C. difficile* wurden unter einer Laminarflow-Haube mit geeigneter persönlicher Schutzausrüstung durchgeführt. Für den Umgang mit den Mäusen wurden die Arbeitsflächen mit dem sporiziden Desinfektionsmittel Dismozon plus sterilisiert, um eine Kreuzkontamination mit Sporen zwischen den Versuchsgruppen zu verhindern.

#### **4.5 SCORING UND BEHANDLUNG DER *C. DIFFICILE* INFEKTION**

Nach der Infektion wurden die Mäuse mindestens einmal täglich auf Körpergewicht, Durchfall, Allgemeinzustand und Verhalten untersucht und gescort. Dazu wurden vor Beginn der Experimente die Abbruchkriterien anhand der Belastungsscores formuliert, siehe Tabelle 4. Die Gewichtsabnahme erwies sich als bester Parameter zur Quantifizierung von Durchfall und wurde zur Überwachung der Schwere der CDI gewählt. Mäuse, die mehr als 10% ihres Ausgangsgewichts verloren hatten, erhielten eine analgetische und krampflösende Behandlung mit Metamizol-Tropfen 50 mg/kg im Trinkwasser. Hierfür wurden fünf Tropfen a 25 mg auf 100 ml Wasser gegeben. Da Novaminsulfon die Eigenschaft besitzt, sich durch Licht zu verfärben und somit die Wirksamkeit nicht länger als 24 Stunden gewährleistet war, wurde dies jeden Tag neu angesetzt. Mäuse, die 15% ihres Körpergewichts verloren hatten, erhielten eine Antibiotikatherapie mit Vancomycin über fünf Tage im Trinkwasser, um die Clostridienmenge im Darm zu reduzieren. Bei der Behandlung mit Vancomycin ist eine Dosierung von 20 mg/kg [94] nötig, was einer Konzentration von 40 mg/ml entspricht. Darüber hinaus erhielten sie am Tag nach Abschluss der Vancomycintherapie eine fäkale mikrobielle Transplantation, um einen Rückfall zu verhindern und die Regeneration der Darmflora zu unterstützen. Dafür wurden acht Fäkalpellets, die von zwei konventionell gehaltenen und unbehandelten Mäusen gesammelt wurden, in 1,5 ml PBS suspendiert, gevortexed, zentrifugiert und 100 µl des Überstands über eine Schlundsonde verabreicht [95, 96]. Für den Fall, dass Mäuse gleichzeitig mit Novaminsulfon und Vancomycin über das Trinkwasser therapiert wurden, wurde das Trinkwasser aus oben genannten Gründen ebenfalls jeden Tag gewechselt und neu angesetzt.

Tabelle 4: Übersicht der Versuchsabbruchkriterien anhand des Belastungsscores

Beobachtungen	Punktwertung
<b>I Körpergewicht bezogen auf Ausgangsgewicht</b>	
- unbeeinflusst oder Anstieg	0
- Gewichtsreduktion > 10 %	10
- Gewichtsreduktion > 20 %	20
<b>II Allgemeinzustand</b>	
- Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber	0
- Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb	5
- verklebte oder feuchte Körperöffnungen, anormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus	10
- Krämpfe, Lähmungen; Tier fühlt sich kalt an	20
<b>III Spontanverhalten</b>	
- normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
- Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen;	10
- Koordinationsstörungen, Schmerzlaute beim Ergreifen; Selbstamputation (Autoaggression)	20
<b>IV Versuchsspezifische Kriterien</b>	
- keine Auffälligkeiten	0
- Durchfall mit Gewichtsverlust bis 10 %	5
- Durchfall mit Gewichtsverlust zwischen 10 und 15 %	10
- Durchfall mit Gewichtsverlust > 20 %	20
- offene Wunden im Bereich der Gelenke oder Pfoten	20
<b>Bewertung, Maßnahmen</b>	<b>Punktsumme</b>
Belastungsgrad 0 = keine Belastung	
Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten (Verkürzung der Beobachtungsintervalle)	0
Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; Analgesie-Schema anpassen	5-9
Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung; bei 24-stündigem Andauern der Belastung:	10-19
Versuch abbrechen, Tier einschläfern	20 oder höher

Punktzahl wird pro Zeile genau 1x vergeben, sobald ein Kriterium erfüllt ist. Auch bei mehreren positiven Befunden pro Zeile kommt es zu keiner Addition der Punkte pro Zeile. Diese Belastungsscore-Tabelle gilt für alle Versuchsanteile, unabhängig davon ob sich die Tiere gerade in der Phase der CDI oder RA befinden.

#### 4.6 DNA-EXTRAKTION AUS STUHLPROBEN DER MÄUSE

Für den Nachweis einer Infektion mit *C. difficile* und die später folgenden Mikrobiomanalysen wurde die DNA aus dem Mäusestuhl extrahiert, wofür an den Tagen 1, 7, 9, 28 und 97 frische Stuhlproben gesammelt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert wurden. Die DNA wurde mit dem ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit nach Herstellerangaben eluiert. Als erstes wurden die Stuhlproben aufgetaut und ca. 200 mg jeder Probe, sowie 750 µl ZymoBIOMICS Lysis Solution in jeweils ein ZR-96 BashingBead Lysis Tube gegeben und fest verschlossen. Die Röhrchen wurden dann im 2 ml - Röhrchenhalter des Fastprep-24 befestigt und mit 6 m/s 3x eine Minute verarbeitet und anschließend bei 10.000xg eine Minute lang zentrifugiert. Danach

wurden 400 µl des Überstands in einen Zymo-Spin IV Spin Filter in einem Collection Tube transferiert und bei 8000xg für eine Minute zentrifugiert. Als nächstes wurde diesem Filtrat 1200 µl des ZymoBIOMICS DNA Binding Buffer hinzugefügt, dem vorher für eine optimales Ergebnis beta-Mercaptoethanol bis zu einer finalen Verdünnung von 0,5 % zugegeben wurde. Von diesem Gemisch wurden 800 µl in ein Zymo-Spin IIIC-Z Column in einem Collection Tube übertragen und bei 10.000xg für eine Minute zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde eben genannter Schritt wiederholt. Der nächste Schritt bestand darin, erst 400 µl des ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 1 in das Zymo-Spin IIIC-Z Column in einem neuen Collection Tube zu geben, dieses bei 10000xg für eine Minute zu zentrifugieren, den Durchfluss zu verwerfen und dann 700 µl des ZymoBIO-MICS DNA Wash Buffer 2 zuzugeben, wiederum zu zentrifugieren und zu verwerfen um nochmal 200 µl des Wash Buffer 2 zuzugeben und zu zentrifugieren. Abschließend wurde der Zymo-Spin IIIC-Z Column in eine sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen umgesetzt und 100 µl ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water direkt auf die Röhrchenmatrix, gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum bei 10.000xg für eine Minute zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Für ein noch besseres Ergebnis wurde die eluierte DNA aus dem vorherigen Schritt in ein präpariertes Zymo-Spin IV-HRC Spin Filter in einem Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und bei lose verschraubtem Deckel genau bei 8000xg eine Minute zentrifugiert. Die gewonnene DNA wurde zur weiteren Verarbeitung und Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

#### **4.7 NACHWEIS DER *C. DIFFICILE* INFektion**

##### **4.7.1 RIDA®QUICK *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TOXIN A/B**

Um eine sichere Infektion mit *C. difficile* nachzuweisen, wurde der Stuhl der Mäuse an mehreren Tagen nach der Verabreichung der Bakterien mittels Schlundsonde untersucht. Dies wurde vorerst mit einem immunchromatografischen Schnelltest (RIDA®QUICK *Clostridium difficile* Toxin A/B) zum qualitativen Nachweis der Toxine A und B von *Clostridium difficile* in Stuhlproben durchgeführt. Toxin A und Toxin B ließ sich so unter Verwendung monoklonaler und polyklonaler Antikörper spezifisch nachweisen und das Ergebnis der Untersuchung lag nach 15 Minuten vor. Vor der Durchführung des Tests wurden die Mäuse einzeln in saubere und leere Käfige gesetzt, bis sie Kot absetzten und diese Stuhlproben wurden anschließend sofort verwendet. Da für die Verwendung dieses Tests für Mäusestuhl keine Evidenzen in der Literatur auffindbar waren, war dies ein Pilotversuch. Im Folgenden wird kurz der Ablauf der Testung dargestellt: Vor der Verwendung wurden die Proben, die Reagenzien, sowie die



Testkassetten auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Probengefäße vorbereitet, indem jeweils 0,5 ml Reagenz A und Reagenz B hineingegeben wurden. Im Falle einer flüssigen Stuhlprobe wurden mit einer Einwegpipette 50 µl im vorbereiteten Reagenzienmix suspendiert – bei fester Stuhlprobe wurden analog 50 mg suspendiert und die Probe wurde durch gründliches Mischen homogenisiert. Nach fünf Minuten Sedimentationszeit wurden 150 µl des weitgehend partikelfreien Überstandes in das Applikationsfeld der Testkassette pipettiert. Bei richtiger Durchführung erschien nach drei Minuten die Kontrollbande an der Kontrolllinie C und nach weiteren zwölf Minuten konnte dann das Ergebnis abgelesen werden. Ein positives Ergebnis zeigte sich durch das Erscheinen zweier Banden, eine an der Kontrolllinie C und eine an der T-Linie. Ein negatives Ergebnis zeigte sich im Umkehrschluss nur durch das Erscheinen der Kontrollbande.

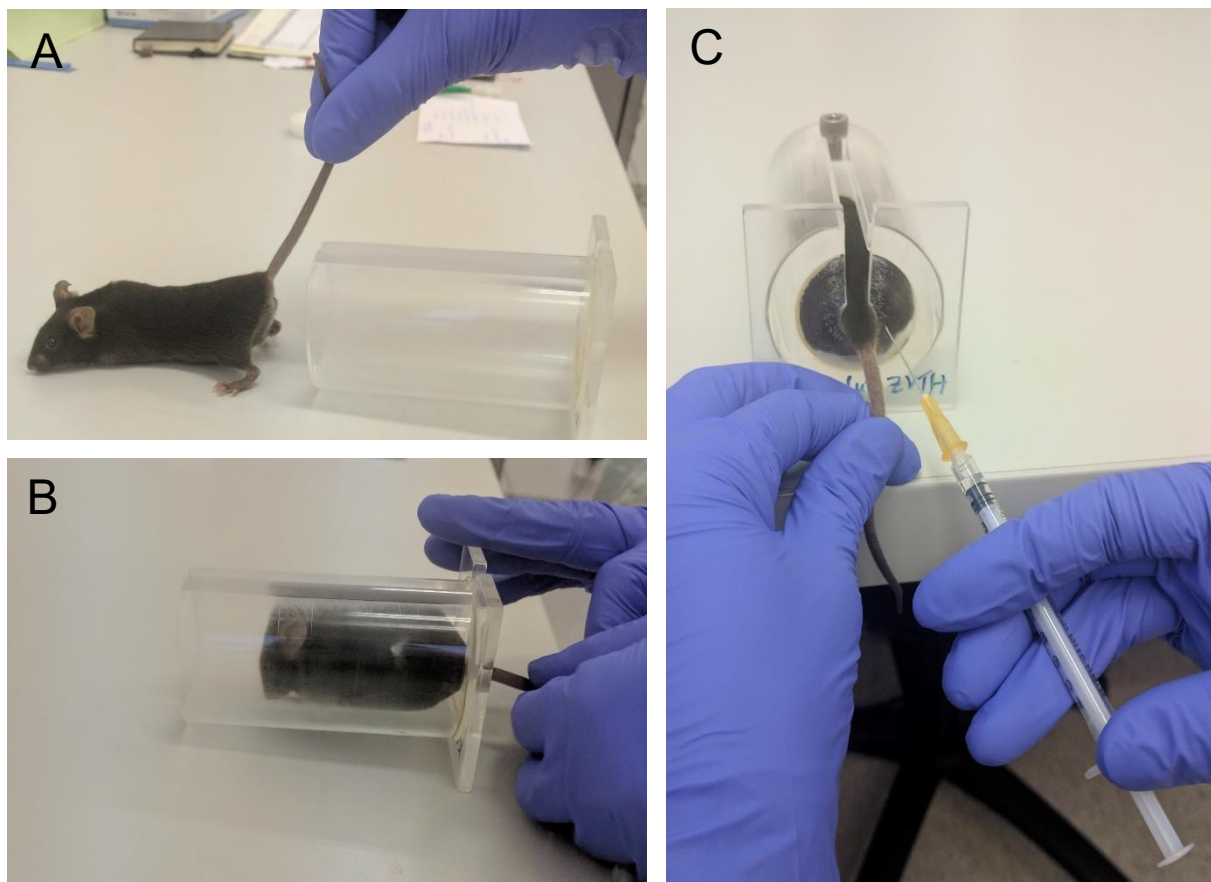
#### **4.7.2 PCR-NACHWEIS DES *C. DIFFICILE* TOXIN A-GENS**

Ein weiteres Standbein zur Überprüfung der Infektion mit *C. difficile* stellte die PCR aus eluierter DNA aus gesammelten Mäusestuhlproben dar, wobei das *C. difficile* Toxin A-Gen nachgewiesen werden sollte.

Mit der eluierten DNA wurden mit freundlicher Unterstützung von Julia Fischer aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Rostock eine Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) in einem endgültigen Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt zur Detektion des *C. difficile* Toxin-A-Gens, das wie folgt aussah: DreamTaq PCR Master Mix (2X), DreamTaq DNA Polymerase, 2X DreamTaq Puffer, dNTPs (0.4 mM) und 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 µl Template-DNA und folgende Primer (je 10 µM) wurden verwendet: tcdA441 (5'-TCT ACC ACT GAA GCA TTA C-3') und tcdA579 (5'-TAG GTA CTG TAG GTT TAT TG-3'), was in einem 158 bp Amplikon resultierte. Die thermischen Zyklusbedingungen in dem Biometra TAdvanced Thermocycler (analytik jena, Jena, Deutschland) waren wie folgt: 95 °C - 1min; 95 °C - 30sec; 47,5 °C - 30sec; 72 °C - 15 sec; 72 °C - 10 min. Die PCR-Amplikone wurden mit einem 2%igen Agarosegel betrieben, in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Beleuchtung visualisiert.

#### 4.8 INDUKTION DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Die Durchführung der Induktion der kollagen-induzierten Arthritis erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Brand et. al, was eine Primär- und eine Sekundärimmunisierung, den sogenannten Boost, beinhaltet [90]. In dieser Arbeit erfolgte die Primärimmunisierung an Tag 28 und die Sekundärimmunisierung 21 Tage später an Tag 49 mittels Injektion an der Schwanzbasis. Die Injektionslösung besteht zum einen aus bovinem Kollagen und zum anderen entweder aus komplettem Freund's Adjuvans (CFA) bei der Primärimmunisierung oder inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) beim Boost. Zur Herstellung der Injektionslösung wurde 17,4 M Eisessig durch einen Spritzenfilter gereinigt und mit destilliertem Wasser auf 0,1 M Essigsäure verdünnt. Anschließend wurden 5ml der 0,1 M Essigsäure mit 10 mg bovinem Kollagen Typ II durch kontinuierliches Rühren mit einem Magnetrührer bei 4 °C für mindestens 12 Stunden vermischt. Die Konzentration der hergestellten Lösung beträgt 2 µg Kollagen pro µl Suspension und wurde in Aliquotgrößen eingefroren, die für den Versuchsablauf sinnvoll erschienen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.



**Abbildung 3: Durchführung der Immunisierung.**

A + B Fixierung der Maus in Restraint C subkutane Injektion rechts der Schwanzbasis

Als nächstes erfolgte die Herstellung des CFA, wobei 100 µg hitzegetötetes *Mykobakterium tuberculosis* mit 25ml IFA vermischt und bis zur Benötigung bei 4°C gelagert wurde. An den jeweiligen Experimenttagen erfolgte kurz vor der Applikation durch Zusammenfügen und Vermengen der Kollagensuspension und CFA oder IFA die endgültige Injektionslösung. Dafür wurden die Kollagenaliquots aufgetaut und das CFA auf Raumtemperatur erwärmt. Der nächste Schritt beinhaltete das Aufziehen der gewünschten Menge CFA in eine 1 ml Spritze, sowie das Aufziehen einer gleichen Menge Kollagensuspension in eine weitere 1 ml Spritze – in der Spritze sollten sich keine Luftblasen befinden. Die Menge der aufgenommenen Kollagenmenge war abhängig von der Anzahl der zu injizierenden Mäuse, wobei pro Maus ca. 280 µg *M.tuberculosis* und 140 µl bovines Kollagen Typ II in einem Gesamtvolumen von 140 µl appliziert werden sollten. Um beide Substanzen miteinander zu vermischen, wurden die Spritzen durch einen Konnektor verbunden. Durch 50x schnelles Hin- und Herdrücken, wurde der Spritzeninhalt der einen Spritze in die andere befördert, sodass sich am Ende des Vorgangs beide Suspensionen durchmischt nur noch in einer Spritze befanden. Nach der Vorbereitung der Injektionslösung wurden die Tiere einzeln aus dem Käfig entnommen und mithilfe einer Halterung so fixiert, dass man freien Zugang zur Schwanzbasis hatte, die Tiere sich aber nicht selbst verletzen konnten. Danach wurde den Mäusen auf beiden Seiten der Schwanzbasis jeweils 70 µl des Kollagen-CFA-Gemisches aus der Spritze als Depot unter das Fell injiziert und sie wurden aus der Halterung zurück in ihren Käfig gesetzt. Drei Wochen später erfolgte die Sekundärimmunisierung, was bis auf die Verwendung von IFA statt CFA analog zur Primärimmunisierung ablief. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Mäuse 2,5 mg Tramadol pro 100 ml Trinkwasser zur Schmerzlinderung.

#### 4.9 VERLAUFSKONTROLLE DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Um den Verlauf und die Schwere der CIA zu quantifizieren, wurden die Mäuse alle drei Tage nach dem Boost auf äußerlich sichtbare Arthritiszeichen wie Rötung oder Schwellung an Hinter- und Vordergliedmaßen untersucht. Hierbei folgten wir einem Punktevergabesystem, mit dem eine maximale Punktzahl von 15 Punkten pro Pfote und somit insgesamt 60 Punkte pro Maus erreicht werden konnten. Als erkrankt galt eine Maus schon ab einem Punktwert von 1.

**Tabelle 5: Übersicht der Punktwerte zum Scoring der kollagen-induzierten Arthritis**

Punktwert	Beschreibung
0	Keine Entzündungszeichen
1	Rötung/Schwellung pro betroffene Phalanx
5	Rötung/Schwellung im Bereich der Metacarpal- und Metatarsalknochen
5	Rötung/Schwellung für betroffene Carpalknochen und -gelenke

#### **4.10 KONTROLLE DES KÖRPERGEWICHTS**

Das Körpergewicht der Tiere wurde kontinuierlich kontrolliert. Da das Gewicht als Hauptindikator für die Schwere der CDI festgelegt wurde, wurden die Tiere während der Antibiotikavorbehandlung und nach der Inokulation mit *C. difficile* jeden Tag gewogen, bis sie ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht hatten. Bis zum Versuchsende wurde das Gewicht alle drei Tage kontrolliert. Im Vorfeld wurden die Abbruchkriterien formuliert, die besagen, dass es bei einem Gewichtsverlust von 20% über 24 Stunden zum Abbruch des Versuchs kommen sollten, siehe Tabelle 4. Die wachen Tiere wurden auf einer herkömmlichen Digitalwaage gewogen und die gemessenen Werte auf eine Nachkommastelle gerundet.

#### **4.11 ANÄSTHESIE DER TIERE**

Da alle Eingriffe und Therapien an den Mäusen ohne Narkotisierung stattfanden, wurden die Mäuse nur vor der zervikalen Dislokation und der retroorbitalen Blutentnahme tief narkotisiert. Dazu wurde den Tieren 0,75 mg Esketamin in Kombination mit 0,05 mg Xylazin pro 10g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Während die Maus im Zwangsgriff gehalten wurde, um das Verletzungsrisiko durch Bewegungen während des Vorgangs zu minimieren, erfolgte die Injektion durch vorsichtige Penetration der Haut am rechten Unterbauch. Das Empfinden der Mäuse wurde nach einigen Minuten mithilfe einer Pinzette an der Schwanzspitze getestet. Zeigten die Tiere darauf keine Reaktion mehr, erfolgte die retroorbitale Blutentnahme und daran anschließend die Tötung durch zervikale Dislokation.

#### **4.12 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG**

Die histologische Aufarbeitung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Marlies Dettmer aus dem Institut für Immunologie der Universität Rostock. Nach der zervikalen Dislokation erfolgte zuerst die Entnahme des Darms. Hierfür wurde die Bauchdecke vom distalen Ende des Sternums bis kurz vor den Anus aufgeschnitten und das Peritoneum vorsichtig durchtrennt. Sowohl der Magen als auch das Rektum wurden aufgesucht und der Darm wurde jeweils an den Übergängen abgesetzt. Da sich der Darm unmittelbar nach der Entfernung aus der Bauchhöhle durch die Wirkung der Längsmuskulatur zusammenzieht und sich das Darmepithel schnell ablöst, müssen die Entnahme und Weiterverarbeitung bis zur Fixierung möglichst schnell erfolgen. Nach der Entnahme aus dem Bauchraum wurde der

Darm in mehrere Segmente unterteilt, was eine einfachere Handhabung ermöglichte. Aufgrund der Länge des Organs lässt sich der gesamte Darm durch eine longitudinale Untersuchung besser beurteilen als durch transversale Schnitte; hierbei wurde einem Protokoll von Bialkowska et al. gefolgt [97]. Die einzelnen Abschnitte wurden mit einer Schere vorsichtig in Längsrichtung aufgeschnitten und der Inhalt mithilfe eines Holzstäbchens entfernt. Anschließend wurde jedes Segment mithilfe eines Holzstäbchens der Länge nach mit der Schleimhaut nach außen aufgerollt, zu einer sogenannten „swiss roll“. Abschließend wurde das Präparat vorsichtig in 4% PFA (Paraformaldehyd) über Nacht fixiert und dann weiter in 70% Ethanol gelagert, in Paraffin eingebettet und laut nachfolgendem Protokoll mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt.

Die Bilder aus dem 4µm Gewebeschnitt wurden mit einer Standard-Lichtmikroskopkamera aufgenommen. Nach der Entnahme des Darms erfolgte die mittige Durchtrennung des linken und rechten Os femoris, sowie Radius und Ulna der rechten und linken Pfote. Noch anhaftendes Weichgewebe wurde jeweils von proximal bis zum Sprunggelenk oder dem Handgelenk entfernt und die abgetrennten Extremitäten getrennt voneinander in Histokassetten in 4% PFA fixiert. Nach 2 Wochen erfolgte die Überführung in 70% Ethanol zur weiteren Lagerung nach vorhergehender 30 minütiger Spülung unter Leitungswasser. Aufgrund der eindeutigen makroskopischen Krankheitsnachweise entschieden wir uns im Verlauf der Experimente jedoch gegen eine histologische Bildgebung der Pfoten und legten unser Hauptaugenmerk hierbei auf die Darmhistologie.

#### **4.13 BLUTANALYSEN**

Die Analyse der Mausseren erfolgte zum Teil mit freundlicher Unterstützung von Herrn Johann Volzke. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurden murine IgG Antikörper gegen *C. difficile*, Antikörper gegen bovines und murines Kollagen Typ II, sowie inflammatorische Zytokine mittels Durchflusszytometer bestimmt. Die Messung der Antikörper erfolgte mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Zur Gewinnung des Blutes wurde am Versuchsende ca. 1 - 1,5 ml Blut pro Maus in tiefer Anästhesie kurz vor der zervikalen Dislokation entnommen. Hierfür wurde eine dünne Glaskapillare am medialen Orbitarand entlanggeschoben und damit schließlich der retroorbitale Venenplexus punktiert. Anschließend wurde das Blut zehn Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, wodurch sich zwei Phasen bildeten. Das Serum als obere Phase wurde extrahiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### **4.13.1 ANTIKÖRPER GEGEN *C. DIFFICILE***

Die Antikörper gegen *C. difficile* Toxine A und B wurden mit dem Clostridium difficile anti-TcdA/B ELISA für die Maus analysiert, wobei die Durchführung nach Herstellerangaben erfolgte. Vor der eigentlichen Testung wurde eine Verdünnungsserie durchgeführt, wobei sich 1:200 als beste Option herausstellte. Von den 1:200 verdünnten Serumproben wurden jeweils 100 µl pro Well auf die 96-Well-Platten aufgetragen, die entweder mit Toxin A oder Toxin B beschichtet waren und anschließend für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Platten für weitere 30 Minuten mit 100 µl Peroxidase gekoppeltem Detektionsantikörper (anti-Maus IgG) bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde durch die Zugabe von 100 µl TMB-Substrat die Farbreaktion gestartet, welche nach 15 Minuten durch Zugabe von 50 µl der Stopplösung gestoppt wurde. Schließlich wurde die Extinktion mit einem automatisierten ELISA-Plattenleser bei 450 nm ermittelt. Die Analyse der antibakteriellen Antikörper erfolgte jeweils für Toxin A und B für jede Maus in Zweifachbestimmung.

#### **4.13.2 MURINE UND BOVINE ANTIKÖRPER GEGEN KOLLAGEN TYP II**

Die Bestimmung der Antikörper gegen bovines und murines Kollagen Typ II wurde wie bereits beschrieben durchgeführt [93], indem ELISA-Platten mit bovinem und murinem Kollagen Typ II in einer Konzentration von 20 µg/ml jeweils über Nacht im Karbonat/Bikarbonat-Puffer bei 4 °C beschichtet wurden. Anschließend erfolgten die Blockierung und Waschung der Platten. Als Nächstes wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:6000 aufgetragen und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Platten mit verdünntem Kaninchen-Anti-Maus-IgG für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Farbreaktion gestoppt und die anschließende Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm.

#### **4.13.3 INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE**

Die Messung der inflammatorischen Zytokinen IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL - 23, IL-27, GM-CSF, IFNβ, IFNγ, MCP-1 und TNFα wurde mit Hilfe eines Multiplex Kits LEGENDplex (BioLegend, San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Analyse wurde ein FACSVerse (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Seren von unbehandelten Kontrolltieren, die auch als Mikrobiomspender dienten, wurde als Hintergrund für die Analysen der Antikörper und Zytokine verwendet.

## **4.14 MIKROBIOMANALYSEN**

### **4.14.1 DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG UND -ANPASSUNG**

Die DNA-Konzentration und -Integritätsbestimmung erfolgte im Anschluss an die DNA-Extraktion mittels Spektrophotometer via Lichtabsorption bei 260 nm. Hierzu wurden 1,2 µl der jeweiligen Probe auf die Messstelle pipettiert und gemessen. Wichtig war dabei auch die Reinheitsbestimmung, welche durch den Wert 260/280 angegeben wurde. Es erwies sich ein Wert über 1,8 als ausreichend, welcher auch bei fast allen Proben erreicht werden konnte. Um die 16S rRNA der DNA-Proben aus dem Mäusestuhl zu sequenzieren, mussten die Konzentrationen der Proben auf einen festgelegten Wert angepasst werden. Hierzu wurden die Proben anschließend mit nukleinfreiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **4.14.2 16S rRNA PCR**

Die PCR wurde mit freundlicher Unterstützung von Jana Bull aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock aus der bereitgestellten DNA durchgeführt. Die Amplicon PCR wurde mit mikrobieller genomischer DNA unter Verwendung einer Konzentration von 5 ng/µl in 10 mM Tris pH 8,5 durchgeführt. Die PCR-Amplifikation der V3/V4-Regionen der bakteriellen 16S rRNA, die das Gen kodiert, wurde mit den Primern Pro341-XT (TCG-TCG-GCA-GCG-TCA-GCG-TCA-GAT-GTG-TAT-AAG-AGA-CAG-CCT-ACG-GGN-BGC-ASC-AG) und Pro805-XT (GTC-TCG-TGGG-GCT-CGGG-AGA-TGT-GTA-TAA-GAG-ACA-GGA-CTA-CTA-CTA-CNV-GGGG-TAT-CTA-ATC-C) durchgeführt, was zu Amplikongrößen von weniger als 550 bp führte. Die Details der Bibliothekskonstruktionen, wie Index-PCR, PCR-Bereinigung 2, Bibliotheksquantifizierung, Normalisierung und Pooling wurden entsprechend dem Illumina "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" Protokoll durchgeführt. Bioanalyzer DNA 1000 Chips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) und Qubit Kits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) wurden für die quantitative und qualitative Kontrolle jeder einzelnen Probenbibliothek und des endgültigen Bibliothekspools eingesetzt. 5 pM der endgültigen Bibliotheksmischung, die mindestens fünf Prozent PhiX-Control enthalten musste, wurde einem einzelnen Sequenzierungslauf mit einer 2x250 oder 2x300cycle Reagenzienkartusche auf einer Illumina MiSeq-Maschine ausgesetzt. Alle Rohdaten fastq files wurden für die Sequenzdatenanalyse verwendet.

#### 4.14.3 SEQUENZDATENANALYSE

Die Sequenzdatenanalyse wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Susanne Kneitz aus dem Institut für Physiologische Chemie des Biozentrums der Universität Würzburg durchgeführt. Die Qualitätsfilterung (zulässige Länge: 440-466 bp, keine mehrdeutigen Basen erlaubt), das Zusammenführen doppelter Sequenzen und die Ausrichtung auf die Referenzdatenbank ([https://www.mothur.org/wiki/Silva\\_reference\\_files#Release\\_128](https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files#Release_128)) erfolgte mit Mothur [98]. Es wurden nur OTUs mit einer Gesamthäufigkeit von  $\geq 3$  berücksichtigt. Sequenzen aus Archäen, Chloroplasten, Eukaryota und Mitochondrien wurden entfernt. Für die deskriptive Community-Analyse und PCA-Plots wurde das CRAN-Paket "vegan" verwendet (<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>). Die Ähnlichkeit wurde als Jaccardindex berechnet, als Maß für die Unähnlichkeit wurde Bray-Curtis verwendet. Für die statistische Analyse von Unterschieden zwischen den Lesezählungen zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Kruskal-Wallis-Tests mit paarweisen Mehrfachvergleichen durch Nemenyi-Tests verwendet. Die fertig analysierten Daten wurden dann zur Weiterverarbeitung in verständliche Abbildung von Frau Dr. Susanne Kneitz bereitgestellt.

#### 4.15 STATISTISCHE ANALYSE

Die Datensätze wurden auf die Gaußsche Normalverteilung getestet, sowie das arithmetische Mittel berechnet. In Abhängigkeit von der Normalverteilung wurden entweder Oneway-ANOVAs oder Kruskal-Wallis-Tests mit anschließenden post-hoc Tests (Dunn's multiple comparison, Tukey's multiple comparison) für den Vergleich zwischen den Gruppen durchgeführt. In einigen Fällen wurden auch T-Tests zum Vergleich zwischen zwei Gruppen verwendet. Die Darstellung der Daten erfolgte als Dotplot oder Mittelwerte. Der Kaplan-Meier-Estimator wurde verwendet, um Unterschiede in der Inzidenz der experimentellen Arthritis zu zeigen mittels Log Rank (Mantel-Cox), Breslow (Generalized Wilcoxon) und Tarone-Ware-Tests. Der Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen inflammatorischen Zytokine erfolgte mittels hierarchischem Clustering. Die Analyse wurde mit GraphPadPrism oder SPSS durchgeführt. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen und wie folgt angegeben:

\* =  $p < 0,05$

\*\* =  $p < 0,01$

\*\*\* =  $p < 0,001$



## V. ERGEBNISSE

### 5.1 DBA1 x B10.Q F1-MÄUSE SIND ANFÄLLIG FÜR EINE INFektion MIT *C. DIFFICILE* UND GEWICHTSVERLUST KORRELIERT MIT PATHOGENITÄT VERABREICHTER *C. DIFF.*-STÄMME

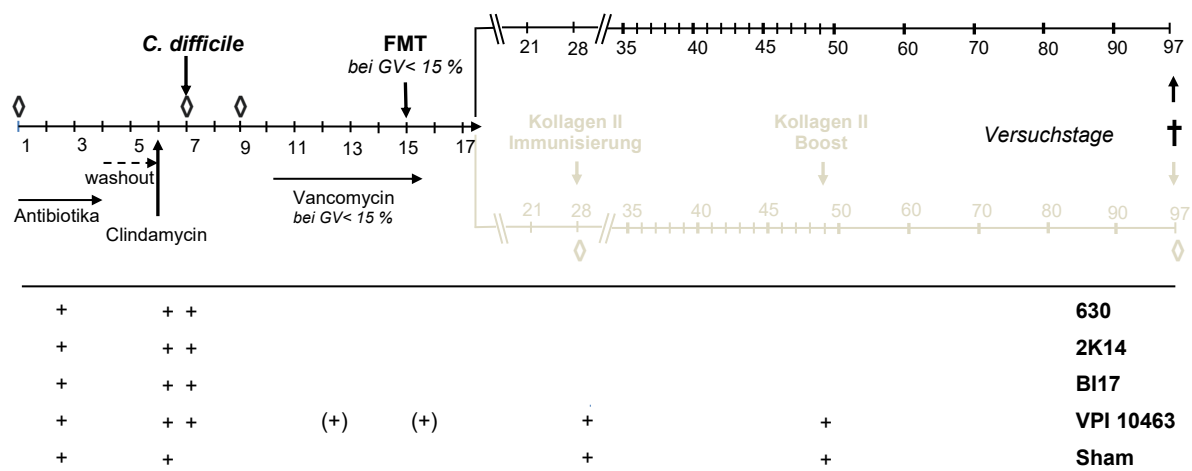
Das Ziel dieser Studie war es zum einen ein Tiermodell zu etablieren, in dem sowohl eine Infektion mit *C. difficile* (CDI), als auch eine kollagen-induzierte Arthritis (CIA) stattfindet und reproduzierbar möglich ist. Zum anderen sollte der Einfluss einer antibiotikaassoziierten Infektion mit *C. difficile* auf die Ausprägung der Arthritis im Mausmodell untersucht werden, sowie eine Analyse der Veränderungen der Zusammensetzung des Mikrobioms im Verlauf. Daher war zunächst das Ziel, den für die Induktion der kollagen-induzierten Arthritis besonders geeigneten Mausstamm DBA1 x B10.Q auf Suszeptibilität für eine Infektion mit *C. difficile* zu untersuchen und den geeignetsten Clostridienstamm zu identifizieren.

Hierfür wurden elf Mäuse mit dem Stamm 630 und je acht Mäuse mit den Stämmen 2K14 und BI17, sowie 15 Mäuse mit dem Stamm VPI 10463 infiziert. Die Unterschiede in der Pathogenität der vier verwendeten Clostridienstämme werden in Tabelle 6 dargestellt [99, 92, 100]. Hintergrund dafür war, dass sich die Reaktionen von Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen auf die Infektion mit verschiedenen *C. difficile* Stämmen unterscheiden. Weitere sechs Mäuse erhielten die Antibiotika-Vorbehandlung und haben als Sham-Gruppe nur eine Medium/Glyzerin-Mischung ohne Bakterien verabreicht bekommen. Die Vorbehandlung umfasste die dreitägige Gabe eines Antibiotikagemisches im Trinkwasser, eine zweitägige Auswaschungsphase, sowie die intraperitoneale Clindamycin-Verabreichung. Nach der oralen Verabreichung der Clostridien am siebten Versuchstag wurden die Mäuse täglich gewogen, um den Gewichtsverlust zu quantifizieren, wobei der Infektionstag als Ausgangswert (100%) galt. Um eine Entscheidung bezüglich der Wahl des Bakterienstammes und der Bakteriendosis zu treffen, wurde der Gewichtsverlust als Parameter herangezogen.

**Tabelle 6: Übersicht der verschiedenen Pathogenitätsmerkmale der verwendeten Clostridienstämme (91,97,98)**

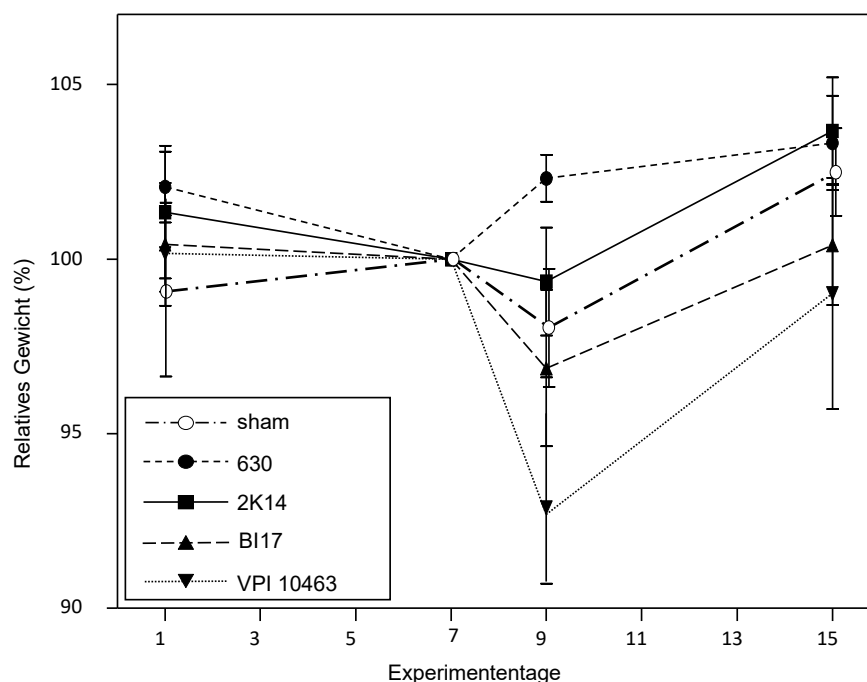
Stamm	Gewichts- verlust	Toxin A	Toxin B	CDT	Sporen- bildung	Toxinsekretion AB	Epithel- schädigung	Neutrophilen- migration	Mortalität der Mäuse Stamm C57BL6/ CD1
<b>630</b>	-	+	+	-	Sehr niedrig	Sehr niedrig nach 48h			-
<b>2K14</b>	niedrig	+	+	-	niedrig	medium	Sehr niedrig	Sehr niedrig	-
<b>BI17</b>	hoch	+	+	+	hoch	medium	niedrig	hoch	-
<b>VP10463</b>	hoch	+	+	-	niedrig	Sehr hoch	hoch	hoch	alle

Eine Maus mit einem Gewichtsverlust von 5% nach Infektion wurde demnach als symptomatisch erkrankt angesehen. Sollten die Mäuse einer Gruppe einen im Mittel geringeren Gewichtsverlust als 5% aufweisen, wäre eine Dosiserhöhung auf  $10^6$  KBE Bakterien nötig. Sollte jedoch ein großer Teil der Mäuse versterben oder müsste aufgrund des hohen Gewichtsverlustes trotz Behandlung aus dem Versuch ausscheiden, wäre eine Dosisreduktion auf  $10^4$  KBE nötig. Bei jeder Maus, die einen Gewichtsverlust von über 15% erlitt, wurde eine Behandlung mittels Vancomycin und einer anschließenden Stuhltransplantation zum Wiederaufbau des Mikrobioms durchgeführt. Im idealen Falle eines mittleren Gewichtsverlustes über 5% der Mäuse einer Gruppe, wäre im Weiteren eine Arthritisinduktion möglich und die Gruppe würde in den nächsten Teil des Versuchs übernommen werden. Außerdem erhielten alle Mäuse im Falle einer Körpergewichtsabnahme von mehr als 5%, sowie Anzeichen von Diarrhöe und Schmerzen eine krampflosende und analgetische Therapie mit Metamizol im Trinkwasser. Details zum Ablauf des ersten Versuchsteils, sowie die Einteilung der Gruppen sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf und Interventionen in einzelnen Versuchsgruppen im ersten Versuchsteil.** Zunächst erfolgte eine dreitägige antibiotische Vorbehandlung der Versuchstiere, gefolgt von einer zweitägigen normalen Trinkwassergabe (washout). An Tag 6 erfolgte eine einmalige intraperitoneale Gabe von Clindamycin. Die Verabreichung der Clostridien mittels Schlundsonde erfolgte an Tag 7. An den Tagen nach der Infektion wurden die Tiere täglich gesortet und entsprechend behandelt. Bei einem Gewichtsverlust von über 15 % erhielten die Mäuse eine fünftägige Therapie mit Vancomycin im Trinkwasser, gefolgt von einer mikrobiellen Stuhltransplantation (FMT). In beiden Fällen wurden die Tiere engmaschig bis zur Regeneration überwacht. Danach wurden sie entweder interventionsfrei beobachtet (630, 2K14, BI17) oder in den weiteren Versuchsteil übernommen (VPI 10463, Sham). An Tag 97 wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation für weitere Analysen getötet. Hellgrau = sich anschließender zweiter Teil des Experiments, ausführlich in Abb. 9 beschrieben. + = Intervention (bspw. Antibiotikagabe) hat stattgefunden, (+) = nur einige Tiere innerhalb einer Gruppe betroffen, Details siehe Text. ◇ = Stuhlsammlung

Abbildung 4 fasst die Ergebnisse bezüglich der Gewichtsentwicklung in den ersten 15 Tagen der Experimente in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zusammen. Die Antibiotika-Vorbehandlung in der ersten Versuchswoche führte bei den Gruppen 630, 2K14, BI17 und VPI 10463 zu keinem oder nur einem geringen Gewichtsverlust, während die Mäuse der Sham-Gruppe eher zunahmen. Nach der oralen Gavage konnte nach zwei Tagen (Tag 9 des Versuchs) ein maximaler Gewichtsverlust erkannt werden, nach welchem sich das Gewicht der Mäuse im Verlauf wieder an das Ausgangsgewicht anpasste. Die Sham-Gruppe und die mit dem Clostridienstamm 2K14 infizierten Mäuse zeigten an Tag 9 kaum Gewichtsverlust, mit relativen Gewichten von 98,8 % in der Sham- und 99,4 %  $\pm$  1,54 in der 2K14-Gruppe. Die mit dem am wenigsten pathogenen *C. difficile* Stamm 630 infizierten Mäuse nahmen sogar an Gewicht zu, mit Werten an Tag 9 von 102,31 %  $\pm$  0,68. Im Gegensatz dazu waren Mäuse, die mit den Stämmen BI17 und VPI 10463 infiziert wurden, stärker betroffen, obwohl nur in der Gruppe VPI 10463 ein mittlerer Gewichtsverlust von mehr als 5% verzeichnet wurde mit 96,88 %  $\pm$  2,24 bei BI17 und 93,65 %  $\pm$  2,14 % in der VPI10364-Gruppe an Tag 9. Um die



**Abbildung 4: DBA/1J x B10.Q F1-Mäuse sind anfällig für eine Infektion mit *C. difficile*, wobei der Gewichtsverlust mit der Pathogenität der *C. difficile* Stämme korreliert.** Gemessen wurde das Körpergewicht jeder Maus an jedem Tag mittels einer Digitalwaage. Dargestellt ist der Verlauf des relativen Körpergewichts der einzelnen Gruppen, bezogen auf das Ausgangsgewicht an Tag 7, an dem auch die Infektion mit  $10^5$  KBE Bakterien oder Placebo erfolgte. Davor erfolgte die antibiotische Vorbehandlung. Die Linien repräsentieren das arithmetische Mittel des Körpergewichts der jeweiligen Versuchsgruppe. Zur besseren Übersicht sind nur einige Messpunkte eingezeichnet. Horizontale Linien entsprechen der Darstellung des Standardfehlers. Gruppengrößen: sham n=7, 630 n=11, 2K14 und BI17 n=8, VPI10364 n=11. Statistische Analyse: OneWay ANOVA  $p < 0,001$ , bonferroni multiple comparison test BI17 vs VPI \*, 2K14 vs. VPI 10463 \*\*\*, 630 vs. VPI 10463 \*\*\*

statistische Signifikanz des Gewichtsverlusts zu überprüfen, wurde das Absolutgewicht am siebten Tag (vor der Infektion) mit dem Gewicht am neunten Tag (zwei Tage nach der Infektion) innerhalb der Versuchsgruppen mittels abhängigem T-Test verglichen, da sich in allen Gruppen in diesem Zeitraum die größte Gewichtsveränderung zeigte, siehe Tabelle 7. Dies diente zur Bestätigung des fünfprozentigen Gewichtsverlustes innerhalb dieses Zeitraumes als Nachweis für eine gelungene Infektion. Hierbei zeigten sich in der Gruppe 630 und VPI 10463 statistisch deutlich signifikante Werte, allerdings handelte es sich bei 630 um eine leichte Gewichtszunahme und nur bei letzterer um einen deutlichen Gewichtsverlust.

Mittels Oneway-ANOVA konnten gruppenspezifischen Unterschiede hinsichtlich der relativen Zunahme des Körpergewichts im Verlauf festgestellt werden mit einem P-Wert von 0,0111. Im anschließend durchgeführten Bonferronis Multiple Comparison Posthoc Test konnte im Vergleich zwischen den Gruppen an Tag 9 nur zwischen 630 und VPI 10463 ein statistisch signifikanter P-Wert unter 0,01 gefunden werden. Da sich die mit VPI 10463 infizierte Gruppe als Geeignetest herausstellte, werden hier Details aus deren Versuchsverlauf dargestellt. Nach der Schlündelung mit den Clostridien erlitten sieben Mäuse einen Gewichtsverlust von 5 – 10 %. Zwei weitere Mäuse verloren über 10 % ihres Ausgangsgewichts. Diesen Tieren wurde zur Schmerz- und Symptommilderung Metamizol im Trinkwasser verabreicht. Des Weiteren konnten zwei von vier Mäusen, die einen Gewichtsverlust von über 15 % aufzeigten, mittels fünftägiger Vancomycintherapie, gefolgt von einer fäkalen mikrobiellen Transplantation erfolgreich behandelt werden und erreichten an Tag 24 und Tag 31 nach der Infektion wieder ihr Ausgangsgewicht. Von den übrigen beiden Mäusen verstarb eine trotz Behandlung am vierten Tag nach Infektion und die andere musste aufgrund eines Gewichtsverlustes von über 20 % am fünften Tag euthanasiert werden. Der Darm der kranken Mäuse wurde für weitere histologische Analysen verwendet. Alle Versuchsgruppen wurden weitere 14 Wochen bis zur zervikalen Dislokation an Tag 97 beobachtet.

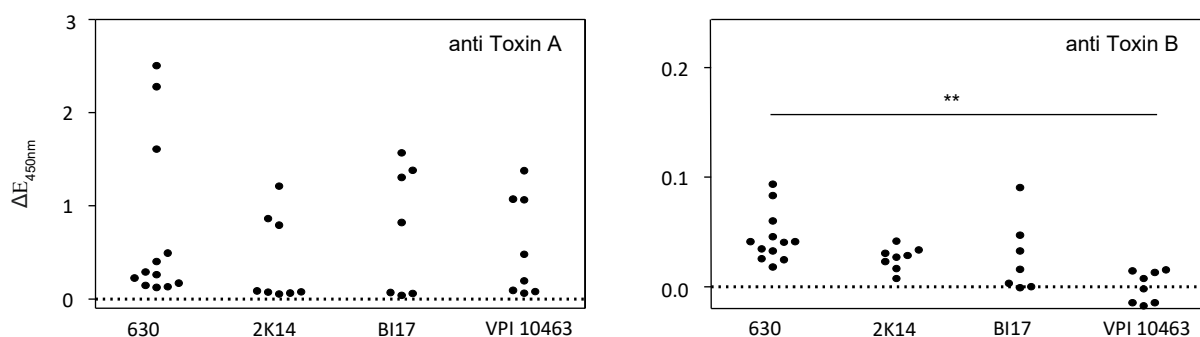
**Tabelle 7: Statistische Analyse des Gewichtsverlaufs von Tag 7 auf Tag 9**  
p-Werte wurden mittels abhängigem T-Test berechnet

Infektion mit <i>C. difficile</i> Stamm	p-Wert
<b>630</b> (n=11)	0,0058
<b>2K14</b> (n=8)	0,7210
<b>BI17</b> (n=8)	0,1746
<b>VPI 10364</b> (n=15)	0,0005
<b>Sham</b> (n=7)	0,1807

Zusammenfassend wurde nur bei der mit *C. difficile* Stamm VPI 10463 infizierten Versuchsgruppe ein statistisch signifikanter mittlerer relativer Gewichtsverlust von über 5 % beobachtet, sodass diese Gruppe in den weiteren Versuchsteil übernommen werden konnte. Anhand der Sham-Gruppe, die ebenfalls in den weiteren Versuch übernommen wurde, konnte bestätigt werden, dass der Prozess des Schlündelns, sowie nur die Verabreichung des Bakterienmediums keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf den Gewichtsverlust hat.

## 5.2 VERGLEICH DER ANTIKÖRPERBILDUNG GEGEN *C. DIFFICILE* TOXIN A UND B NACH INFektion MIT UNTERSCHIEDLICHEN *C. DIFFICILE*-STÄMMEN

Am Ende des Experiments wurde den Mäusen kurz vor der zervikalen Dislokation Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen. Anschließend erfolgte eine Antikörperdiagnostik im Serum, um zu ermitteln, ob die Infektion auch bei den Mäusen erfolgreich war, die keinen Gewichtsverlust zeigten und ob die Wahl des Clostridienstammes einen Einfluss auf die Antikörperbildung hat. Zusätzlich war von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und der Höhe der Antikörpertiter besteht. Hierbei wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm der IgG Antikörper gegen das *C. difficile* Toxin A und B mittels ELISA gemessen. Die Bestimmung erfolgte in Zweifachbestimmung, wobei das Serum gesunder Mäuse als Hintergrund fungierte. Obwohl nur die mit VPI 10463 infizierten Mäuse deutliche klinische Symptome entwickelten, zeigten alle Gruppen ähnliche Titer gegen das Toxin A. Im Gegensatz dazu konnten bei dem am wenigsten pathogenen Clostridienstamm 630 sogar höhere Extinktionen der Antikörper gegen das Toxin B gemessen werden als bei VPI, wobei sich die Titer insgesamt sehr niedrig zeigten.



**Abbildung 5: Vergleichbare IgG Serumantikörper gegen *C. difficile* Toxine.** Bestimmt wurden die Serumantikörpertiter gegen die *C. difficile* Toxine A und B am Versuchsende mittels ELISA. Die Extinktionswerte wurden bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen und sind dargestellt als das Delta der Extinktion nach Abzug der nicht-infizierten Kontrollwerte. Dargestellt sind 4 Gruppen die mit den Clostridienstämmen 630, 2K14, BI17 und VPI 10463 infiziert wurden, wobei jeder Punkt eine Maus repräsentiert. One-way ANOVA: keine gruppenspezifischen Unterschiede bezügl. anti Toxin A, \*\* 630 vs VPI 10463 bei Toxin B

Es konnte festgestellt werden, dass die Antikörpertiter gegen Toxin A zwar teilweise gering ausgeprägt waren, aber dennoch allesamt erhöht, was für eine erfolgreiche Infektion der Tiere spricht. Es konnte keine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter und dem Gewichtsverlust bei den einzelnen Versuchstieren detektiert werden (nicht dargestellt). Die relative mittlere Extinktion der Antikörpertiter gegen Toxin A betrug für die mit 630 infizierten Tiere 0,7195, für 2K14 0,4028, für BI17 0,7494 und für VPI 10463 0,5532. Die Werte wiesen allerdings im Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Bei Toxin B hingegen betrugen die Extinktionen bei 630 0,04496, bei 2K14 0,0260, bei BI17 0,02686 und bei VPI 10463 0,00025. Der direkte Wertevergleich mittels Oneway-ANOVA der Gruppe 630 und VPI 10463 zeigte hochsignifikante Unterschiede.

### 5.3 BESTÄTIGUNG DER *C. DIFFICILE* INFEKTION MIT RIDAQUICK UND TOXIN-PCR IM STUHL

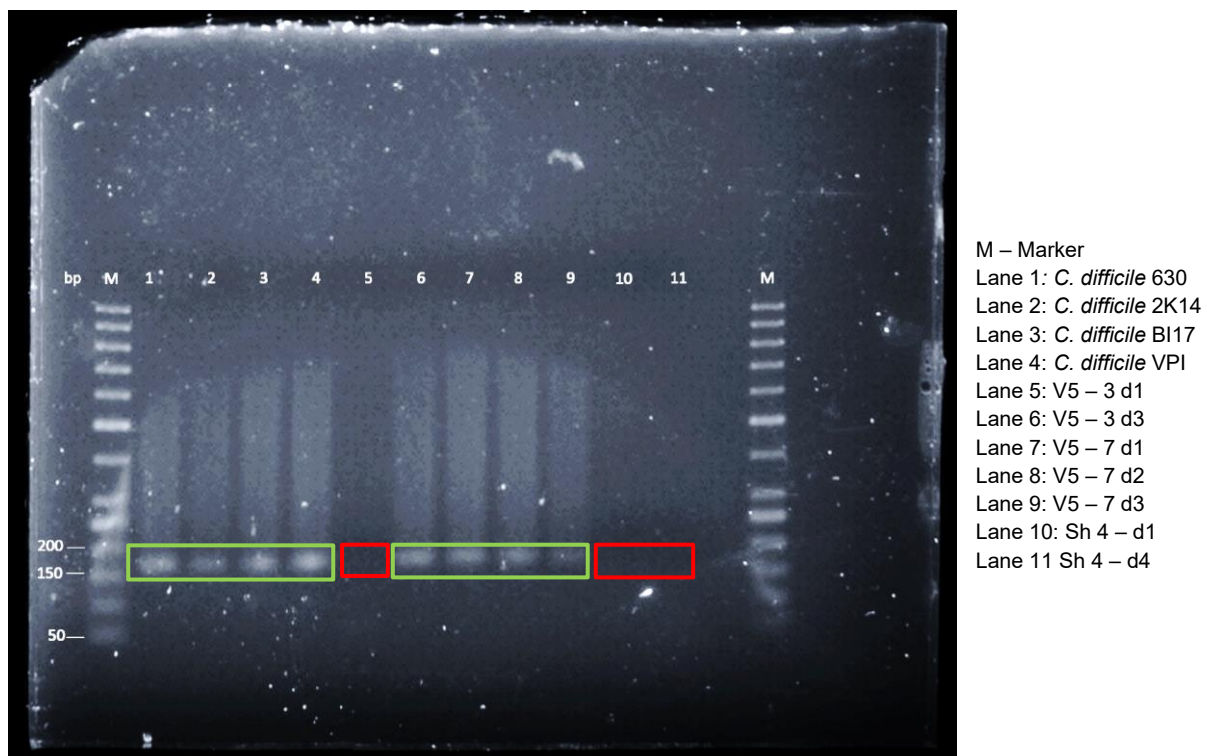
Um die erfolgreiche Infektion mit Clostridien mittels direkten Nachweises (nicht über Antikörper) bestätigen zu können, wurde am zweiten Tag nach der Infektion mit *C. difficile* käfigweise der RIDAQUICK Schnelltest durchgeführt, siehe Abbildung 6. Dieser Test wird auch im Klinikalltag bei Patienten mit Verdacht auf eine Clostridieninfektion verwendet und sollte einen schnellen Überblick über das Vorhandensein der Clostridientoxine A und B im Stuhl der Mäuse verschaffen. Es konnten jedoch keine wegweisenden Hinweise aus den Ergebnissen der Schnelltests gelesen werden, da der Test auch bei fünf von sechs Sham-Mäusen, die nicht mit *C. difficile* infiziert wurden, positiv ausfiel.



**Abbildung 6:** Alle mit VPI 10463 infizierten Mäuse zeigen positives Ergebnis im RidaQuick Toxin Assay. Zu sehen sind hier 5 Testkassetten der unterschiedlichen mit *C. difficile* VPI 10463 infizierten Mäuse im Hauptexperiment am 2. Tag nach Infektion. C = Kontrolllinie, T = positives Testergebnis. V5-3-7 sind die unterschiedlichen Käfiggruppen der mit *C. difficile* infizierten Mäuse.

Ein weiterer Ansatz wurde verfolgt, um die erfolgreiche Infektion zu bestätigen. Mit Unterstützung von Frau Julia Fischer wurde eine PCR aus der eluierten Mäusestuhl-DNA zur Detektion des *C. difficile* Toxin A-Gens an fünf unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Die PCR-Amplikone wurden unter UV-Beleuchtung visualisiert und bei Vorhandensein einer Bande bei 158 bp, was der Länge des Toxins entspricht, als positiver Nachweis gewertet. In Abbildung 7 ist exemplarisch die UV-Visualisierung der Banden auf Höhe des Toxins bei 158 bp dargestellt.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der PCR für den Toxinnachweis in allen Versuchsgruppen, die unterteilt in die einzelnen Mäuse oder Käfiggruppen dargestellt sind, zusammengefasst. Die Zeitpunkte stimmen mit den in Abbildung 3 und 9 dargestellten Stuhlsammelzeitpunkten überein, da aus diesen Stuhlproben die DNA für die PCR eluiert wurde. Die erste Stuhlsammlung erfolgte am ersten Tag des Experiments, noch vor der Antibiotikagabe. Die zweite Kollektion erfolgte am siebten Tag, kurz vor der Infektion mit den Bakterien. Die nächsten drei Stuhlproben wurden zwei Tage nach der Infektion, kurz vor der Primärimmunisierung an Tag 24 und am Ende des Experiments an Tag 97 gesammelt.



**Abbildung 7: Darstellung einer exemplarischen qualitativen *C. difficile* Toxin A Gen - PCR aus eluierter Mäusestuhl-DNA mittels UV-Visualisierung der Banden.** M-Marker = Kontrolle, 1-4: Amplikone aus Bakterienvials der gezüchteten Clostridienstämme als Nachweis der Toxin-A-Produktion. 6-9: Amplikone aus zwei verschiedenen Stuhlproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit *C. difficile*. Bsp.: V5 (Maus wurde mit  $10^5$  KBE VPI 10463 infiziert) – 3 (3.Käfigkonstellation aus dieser Gruppe) - d1 (erster Stuhlsammelzeitpunkt), Sh = Shamgruppe. VPI = VPI 10463. Bp = Basenpaare, Grüne Umrandung = Bande bei 158bp, gewertet als positiver Nachweis des Toxins, rote Umrandung = keine Bande bei 158bp, gewertet als negativer Nachweis des Toxins

Wie erwartet konnte an den ersten beiden Zeitpunkten kein Toxingen im Stuhl der Mäuse nachgewiesen werden, außer in einer Mäusegruppe nach der Antibiotikagabe. Einen Tag nach der Infektion zeigten sich die Toxingenbanden bei allen infizierten Mäusen, als Bestätigung für die stattgefundene Infektion; allerdings ebenfalls bei einer nicht-infizierten Sham-Käfiggruppe. Im Verlauf konnten bei den folgenden Stuhlproben meist negative, aber auch drei positive Testergebnisse in infizierten Mäusegruppen verzeichnet werden. Zu diesen späten Zeitpunkten konnte jedoch bei keiner dieser Mäusegruppen typische Symptome einer Clostridieninfektion entdeckt werden.

Zusammenfassend konnte man in dieser Arbeit mithilfe der PCR aus Mäusestuhl-DNA bei infizierten Mäusen das bakterielle Toxingen A nachweisen, was für eine erfolgreich stattgefundene Infektion mit *C. difficile* spricht.

**Tabelle 8: Nachweis von *C. difficile*-Toxin-Gen A aus Stuhl-DNA mittels PCR**

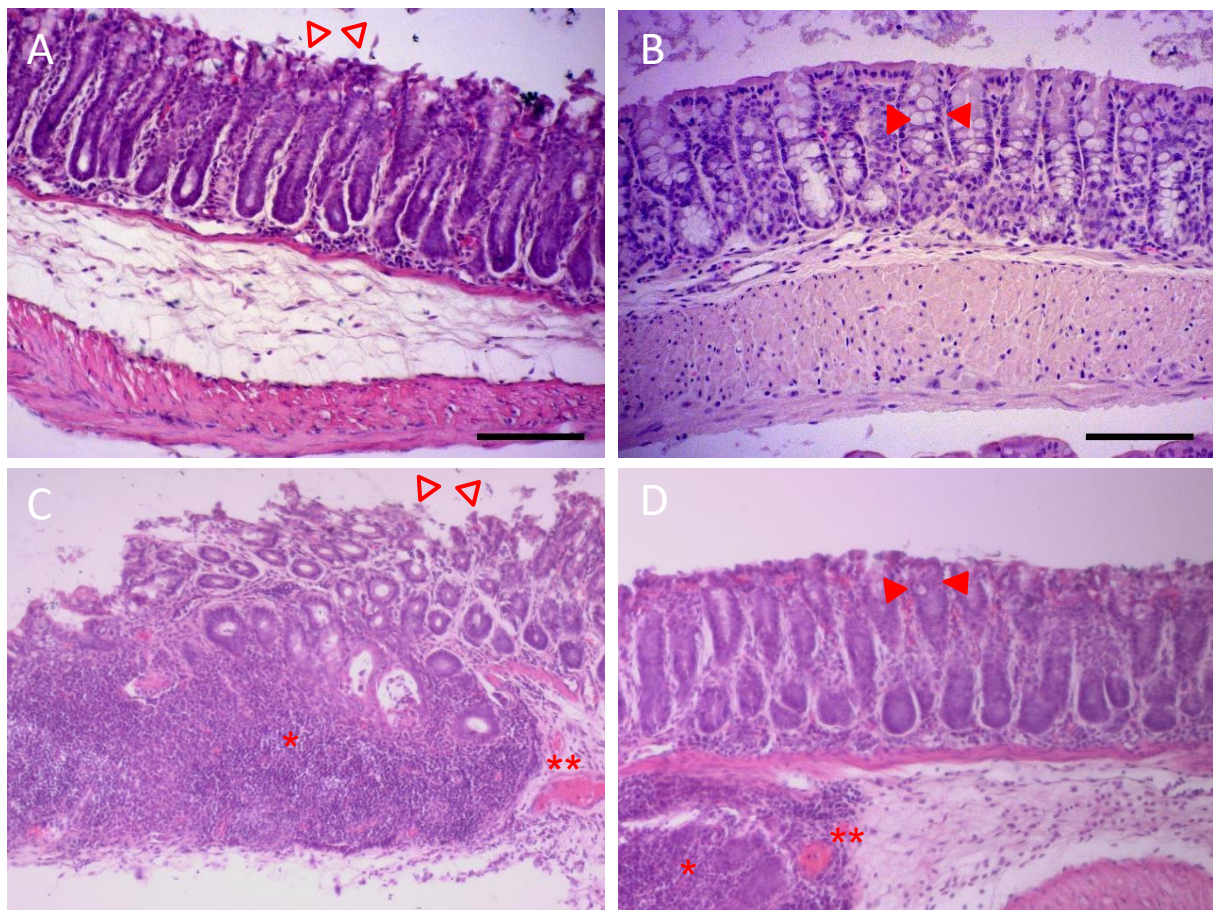
Sammelzeitpunkt		1	2	3	4	5
CDI+CIA	V5-3 (n=3)	-	-	+	-	-
	V5-4.2 (n=1)	-	-	+	-	-
	V5-6.2 (n=1)	-	-	+	+	-
	V5-9 (n=2)	-	-	+	-	-
Gruppe	V5-4.1 (n=1)	-	-	+	-	-
	V5-5 (n=2)	-	+	+	-	-
	V5-6.1 (n=1)	-	-	+	+	-
	V5-7 (n=2)	-	-	+	-	-
	V5-8 (n=2)	-	-	+	-	+
Sham	Sh1+2 (n=2)	-	-	+	-	-
	Sh-3 (n=2)	-	-	-	-	-
	Sh-4 (n=2)	-	-	-	-	-

#### 5.4 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG DES DARMS

Zur Verifikation einer lokalen Entzündungsreaktion im Darm der Mäuse als Ursache für die Symptome nach einer Infektion mit dem Clostridienstamm VPI 10463, wurde dieser auf histologische Veränderungen untersucht. Hierzu wurden drei Mäuse mit deutlichem Gewichtsverlust wenige Tag nach der Infektion geopfert. Bei einer Clostridieninfektion kommt es häufig zu einer ulzerösen Enteritis, wobei es sich bei dem Hauptmanifestationsort eher um das Colon handelt. Die schwerste Ausprägung der CDI beim Menschen ist das Bild des toxischen Megacolons, das mit einer sehr hohen Sterblichkeit behaftet ist.



Sowohl das Dickdarm-, als auch das Dünndarmgewebe zeigten nach der Infektion mit Clostridien histologische Anzeichen einer erosiven Enteritis, siehe Abbildung 8. Dies stellte sich mit oberflächlichen Epithelnekrosen und der Freisetzung sowohl von entzündlichen Exsudaten als auch von nekrotischem Zellmaterial in das Darmlumen dar. Zusätzlich konnte eine verminderte Anzahl muzinhaltiger Epithelbläschen entdeckt werden, was auf eine Beeinträchtigung der Becherzellen hinweist. Außerdem erscheint die submukosale Schicht als Folge eines Ödems verdickt und enthält vergrößerte Kapillargefäße sowie eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellen. Diese histopathologischen Veränderungen sind bei gesunden Mäusen nicht nachweisbar. Um die Anzahl der verwendeten Tiere möglichst gering zu halten, entschieden wir uns hierbei nur für eine exemplarische Darstellung der clostridientypischen Veränderungen am Mäusedarm.

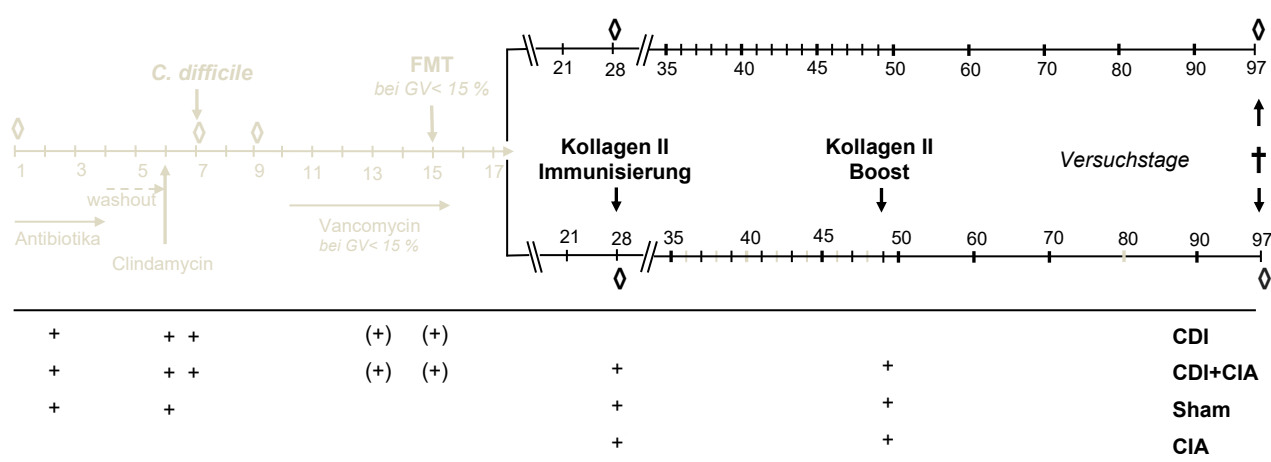


**Abbildung 8: Eine Infektion mit dem Clostridienstamm VPI 10463 führt zu einer histologisch sichtbaren ulzerativen Enteritis.** Exemplarische Darstellung H&E gefärbter 4µm Gewebeschnitte des Dünn- und Dickdarms. A: symptomatischer Dickdarm, B: asymptomatischer Dickdarm, C+D: symptomatischer Dünndarm. Darstellung in 20x Vergrößerung. Scale Bars repräsentieren 50µm. Oberflächliche Epithelnekrosen und entzündliche Exsudate (siehe hohle Pfeile in A und C), verminderte Anzahl muzinhaltiger Epithelbläschen (siehe Vergleich der ausgefüllten Pfeile in B und D) A und C, verdickte submukosale Schicht mit inflammatorischen Infiltraten (siehe \*) und vergrößerten Kapillargefäßen (siehe \*\*)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass klare Hinweise auf Entzündungen sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm beobachtet werden konnten, wodurch sich der durch die Barriestörung im Darm entstehende Durchfall als Symptom durch den quantitativ messbaren Parameter „Gewichtsverlust“ ableiten lässt.

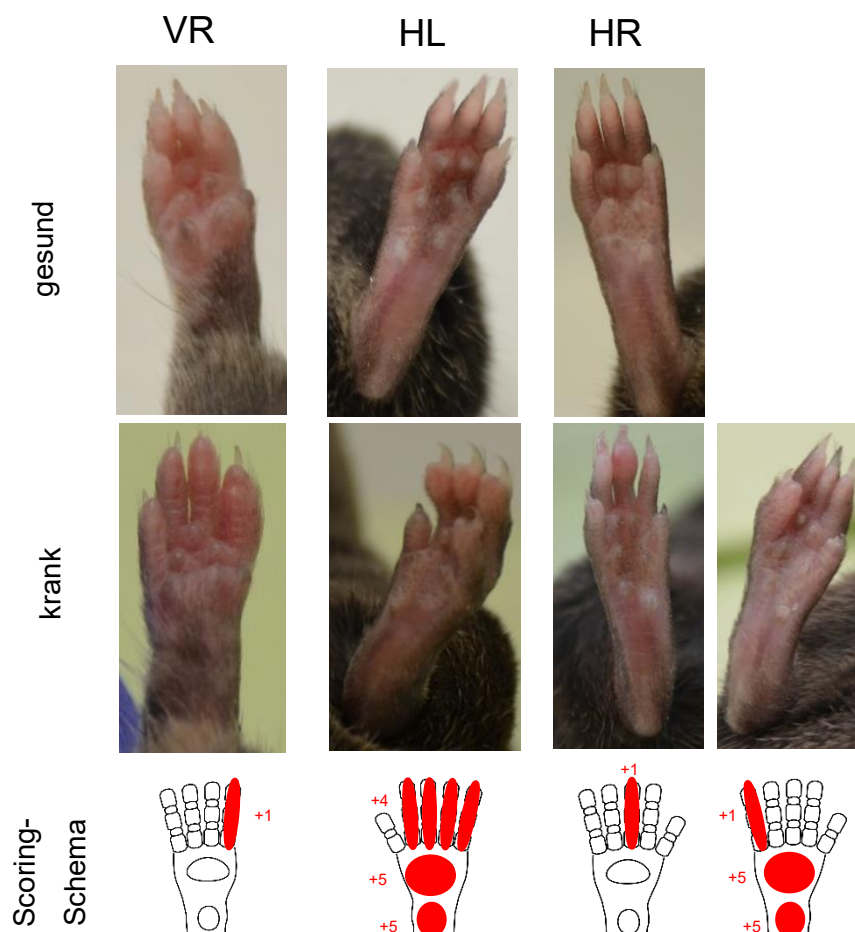
## 5.5 QUANTIFIZIERUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Als nächstes wurden die Auswirkungen der Mikrobiomstörung durch die Antibiotikagabe und/oder der Exposition gegenüber *C. difficile* auf die Entwicklung einer späteren Arthritis untersucht. Hierzu wurden die Mäuse der ehemaligen Versuchsgruppe VPI 10463 zufällig auf zwei Gruppen verteilt (CDI und CDI+CIA) und die Sham-Gruppe wurde ebenfalls übernommen. Zusätzlich wurde eine weitere Versuchsgruppe etabliert, die vor der Induktion der CIA keine Behandlung erfuhr. Die Einteilung der Gruppen, sowie der Ablauf des Experiments ist in Abbildung 9 detailliert dargestellt. Kurz zusammengefasst gab es die beiden aus dem ersten Versuchsteil übernommenen Gruppen, wobei eine keine weitere Behandlung erfuhr und so als Kontrollgruppe diente, um eine spontane Arthritisentwicklung ausschließen zu können (CDI). Bei der anderen Gruppe (CDI+CIA) wurde nach der Clostridieninfektion aus dem ersten Versuchsteil eine CIA induziert. Bei den Mäusen der Sham-Gruppe (sham) wurde



**Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf und Einteilung der Mäusegruppen im zweiten Versuchsteil.** Der erste Teil des Versuchs (hellgrau) wurde ausführlich in Abbildung 3 beschrieben. Die erste Intervention des zweiten Versuchsteils erfolgte an Tag 28 mit der Primärimmunisierung mit Kollagen Typ II und Komplettem Freund's Adjuvans. Bis zur Sekundärimmunisierung, dem Boost, an Tag 49 mit Kollagen Typ II und Inkomplettem Freund's Adjuvans, wurden die Mäuse lediglich alle 3 Tage gewogen. Ab Tag 49 bis zum Ende des Experiments wurden die Versuchstiere regelmäßig auf Zeichen der CIA gesort, gewogen und erhielten orale Analgesie in Form von Tramadol im Trinkwasser. Außerdem sind die Zeitpunkte des Stuhlsammelns (◇) für die späteren Mikrobiomanalysen an Tag 0, 7, 9, 28 und 97 dargestellt. Abschließend wurden die Mäuse an Tag 97 mittels zervikaler Dislokation in tiefer Narkose getötet und es folgte die weitere Auswertung des Experiments. Zusätzlich zeigt die Abbildung die Einteilung der vier Mäusegruppen im zweiten Versuchsteil. + = Intervention (bspw. FMT) hat stattgefunden, (+) = nur einige Tiere innerhalb einer Gruppe betroffen. Details siehe Text.

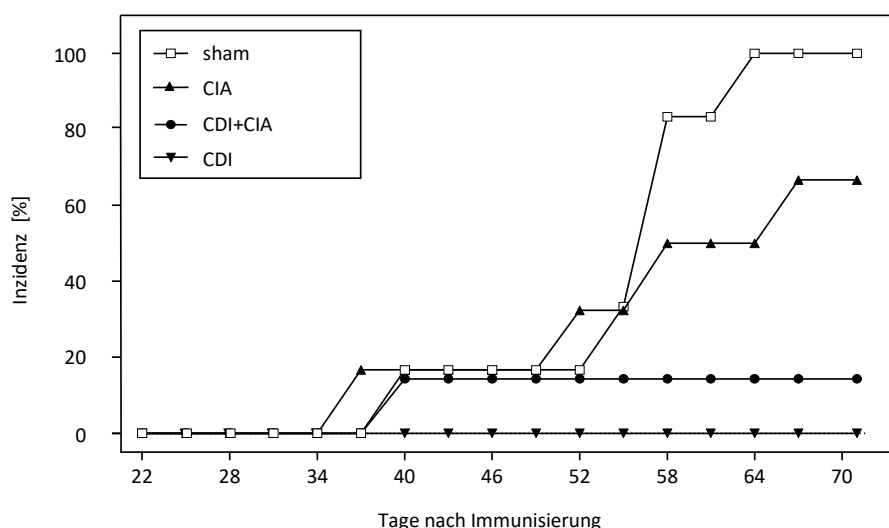
ebenfalls nachfolgend eine CIA induziert, um so die Effekte der Antibiotikavorbehandlung ohne eine nachfolgende Clostridieninfektion auf die Entwicklung der Arthritis untersuchen zu können. Die neu etablierte Gruppe (CIA) diente zum Vergleich der Ausprägung der Arthritis mit den anderen Gruppen. Nach 28 Tagen ab Versuchsbeginn erfolgte die Induktion der kollagen-induzierten Arthritis. Hierbei wurden die Mäuse zuerst mit Kollagen Typ II und komplettem Freund's Adjuvans (CFA) immunisiert und drei Wochen später mit Kollagen Typ II und inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) geboostet – was der Sekundärimmunisierung entspricht. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tiere jeden dritten Tag auf makroskopische Anzeichen einer Arthritis gescort bis zum Versuchstag 97, an dem die zervikale Dislokation erfolgte. Zur Schmerzreduktion im Falle einer auftretenden Arthritis erhielten die Tiere Tramal im Trinkwasser.



**Abbildung 10: Deutliche makroskopische Zeichen einer Arthritis nach Induktion der CIA.** Exemplarische Darstellung von Pfoten gesunder (gesund) und an kollagen-induzierter Arthritis erkrankter Mäuse (krank). Darunter ist das Scoring-Schema mit Punktevergabe dargestellt. VR = rechter Vorderlauf, HL = linker Hinterlauf, HR = rechter Hinterlauf.

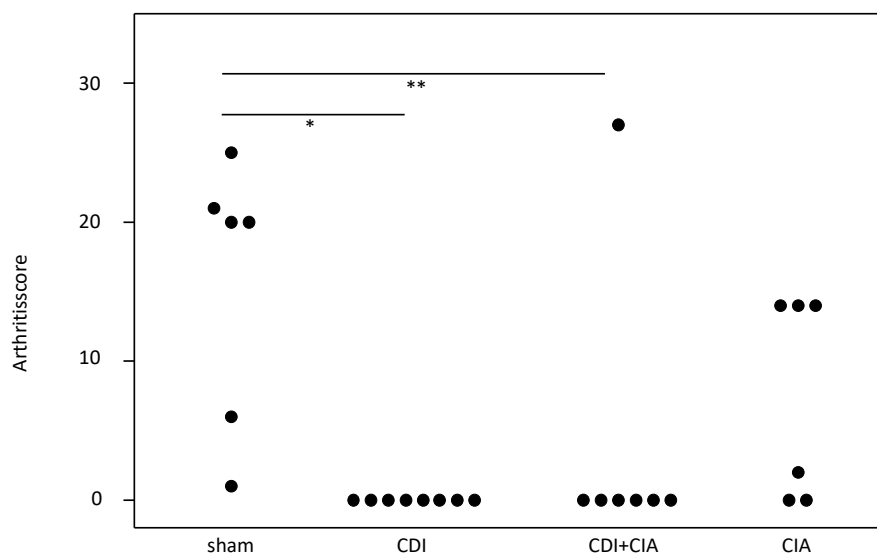
Für das Scoring der Arthritis wurde pro Extremität einer Maus ein Punktwert erhoben, die Summe daraus pro Tier und Tag errechnet und letztlich der Mittelwert gruppenweise ermittelt. Die Quantifizierung der Arthritis erfolgte schließlich durch den Vergleich des Schweregrads anhand der Scores, sowie den Vergleich der Inzidenzen über den Beobachtungszeitraum zwischen der Sekundärimmunisierung bis zum Versuchsende. Das makroskopische Scoring wird anhand Abbildung 10 exemplarisch erklärt. Unten links ist eine rechte Vorderpfote mit einem entzündeten Zeh zu sehen, was einem Arthritisscore von 1 entspricht. In der Mitte ist ein entzündeter linker Hinterlauf mit vier entzündeten Zehen und einem geschwollenen Metacarpal- und Carpalknochenbereich zu sehen, was einem Score von 14 Punkten entspricht. Auf der rechten Seite sind rechte Hinterpfoten (HR) dargestellt mit einem einzelnen entzündeten mittleren Zeh mit einem Punktwert von 1, sowie daneben eine Pfote, die durch einen entzündeten Zeh, Carpal- und Metacarpalbereich 11 Punkte erreicht.

Die kumulative Inzidenz der kollagen-induzierten Arthritis am Ende des Beobachtungszeitraumes der einzelnen Versuchsgruppen betrug 100 % für Sham, 66 % für CIA und nur 16 % für CDI+CIA. Da in der CDI-Gruppe keine Inzidenz verzeichnet wurde, konnte somit ein spontanes Auftreten der Arthritis ausgeschlossen werden, da nicht-immunisierte Mäuse auch keine arthritischen Symptome entwickelten, siehe Abbildung 11.



**Abbildung 11: Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 reduziert die Inzidenz von kollagen-induzierter Arthritis, wohingegen die alleinige Antibiotikavorbereitung zu einer Verstärkung führt.** Gemessen wurde die Inzidenz von makroskopischen arthritischen Symptomen ab dem Tag nach der Sekundärimmunisierung der kollagen-induzierten Arthritis ab Tag 22 bis zum Ende des Experiments an Tag 97. Gruppengröße: sham n=6, CDI n=8, CDI+CIA n=7, CIA = 6. Statistische Tests zum Vergleich der unterschiedlichen Entwicklungen von CIA-Symptomen im Verlauf: Breslow-Test (generalisierter Wilcoxon) zur Analyse der frühen Entwicklungsphase. Tarone-Ware Test zur Analyse der mittleren Beobachtungsphase. Log Rank (Mantel-Cox) Test zum Vergleich der späten Experimentphase.

Bei der Auswertung der Arthritiscores zeigten die Mäuse der Sham-Gruppe den höchsten relativen Mittelwert mit 15,5, gefolgt von den Mäusen, die vor der Induktion der CIA keine Interventionen erfahren haben mit 7,33 (CIA). In der Gruppe, die vor der CIA mit Clostridien infiziert wurde (CDI+CIA), erkrankte nur eine Maus mit einem Score von 27, wodurch sich ein Mittelwert von 3,875 in dieser Gruppe ergab, siehe Abbildung 12. Wie erwartet erkrankte in der nur mit Clostridien infizierten Mäusegruppe CDI keine Maus spontan an einer Arthritis und somit wurde hier ein Mittelwert von 0 verzeichnet. Mit einem im Anschluss durchgeführten Kruskal-Wallis-Test wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Sham und CDI mit einem P-Wert  $< 0,05$ , sowie zwischen Sham und CDI+CIA mit einem P-Wert  $< 0,01$  festgestellt.



**Abbildung 12: Höchste Arthritiscores am Versuchsende in sham- und CIA-Gruppe, sehr niedriger Score in mit *C. difficile* infizierter Gruppe.** Die Scores wurden mittels visueller Beurteilung der Schwere der arthritischen Symptome an den Extremitäten ermittelt. Punkteskala: minimaler Punktwert 0 = keine arthritischen Symptome, maximaler Punktwert pro Tier 60 = maximale Ausprägung der arthritischen Symptome an allen Extremitäten pro Maus. Jeder Punkt entspricht dem Score eines Versuchstiers an Experimenttag 97. Statistische Auswertung mittels Kruskal Wallis Test: CDI vs. Sham \*, sham vs. CDI+CIA \*\*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Infektion mit dem Clostridienstamm VPI 10463 die Inzidenz einer nachfolgenden kollagen-induzierten Arthritis stark reduzierte, während die bloße Vorbehandlung mit Antibiotika und anschließender Placebogabe zu einer höheren Inzidenz und einer verstärkten Gelenkentzündung führte.

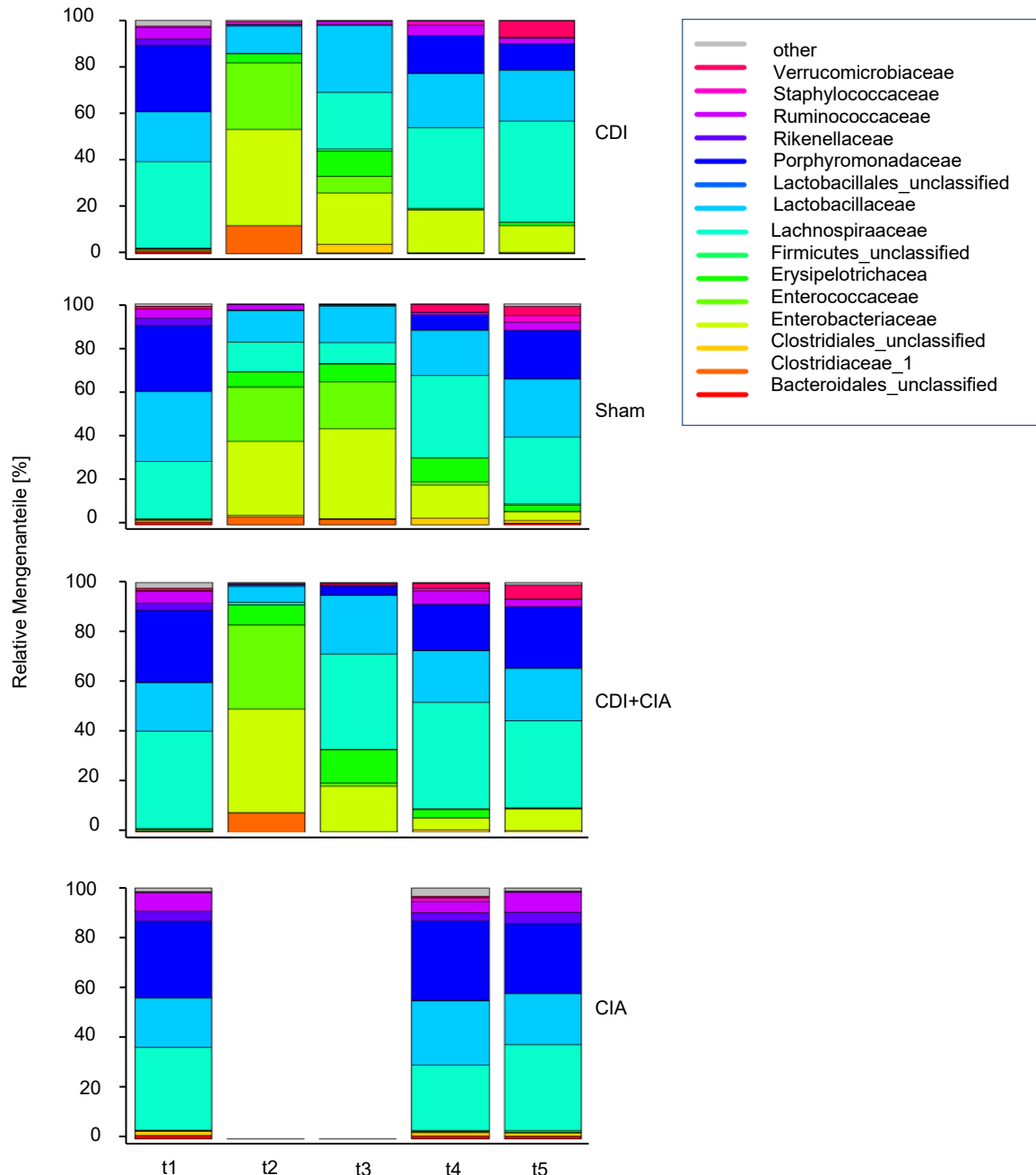
## 5.6 MIKROBIOMANALYSEN

Um zu untersuchen, ob die Inzidenz und Schwere der Arthritis mit einem bestimmten Darmmikrobiom verbunden werden kann, wurde die mikrobielle Zusammensetzung der Stuhlproben der Versuchstiere analysiert. Hierfür wurde während des gesamten Experiments an fünf Zeitpunkten frische Stuhlpellets gesammelt, siehe Abbildung 9. Da die Stuhlproben der Mäuse eines Käfigs gepoolt wurden, konnte eine Probe auch mehrere Stuhlpellets enthalten und es gab mehrere Stuhlproben pro Zeitpunkt. Die CDI-Gruppe (n=8) ergab somit fünf Stuhlproben pro Zeitpunkt, die CDI+CIA-Gruppe (n=7) vier, die Sham-Gruppe (n=6) drei und die CIA-Gruppe (n=6) zwei Stuhlproben pro Sammelzeitpunkt. Aus diesen wurde DNA extrahiert, die mikrobielle 16S rRNA mittels PCR amplifiziert und die Sequenzen mit LEVEL5 prozessiert. Anschließend wurden die mittleren relativen Häufigkeiten der häufigsten vorkommenden Spezies im Mäusestuhl pro Versuchsgruppe prozentual dargestellt. Zunächst zeigten alle Versuchsgruppen bei t1, vor Beginn der Antibiotikabehandlung, eine vergleichbare mikrobielle Zusammensetzung. Diese wird von Porphyromonadaceae (CDI:  $28,34 \pm 4,16$ , CDI+CIA:  $29,85 \pm 7,3$ , Sham:  $30,06 \pm 3,48$ , CIA:  $28,12 \pm 3,67$ ), Lactobacillaceae (CDI:  $21,88 \pm 6,49$ , CDI+CIA:  $18,58 \pm 5,27$ , Sham:  $31,25 \pm 3,7$ , CIA:  $19,15 \pm 6,31$ ), Lachnospiraceae (CDI:  $36,77 \pm 7,59$ , CDI+CIA:  $38,21 \pm 11,3$ , Sham:  $25,80 \pm 0,79$ , CIA:  $28,82$  und  $37,97$ ) und in geringen Mengen von Ruminococcaceae (CDI:  $4,64 \pm 2,02$ , CDI+CIA:  $4,63 \pm 1,22$ , Sham:  $4,2 \pm 0,98$ , CIA:  $7,6 \pm 2,57$ ) und Rikenellaceae dominiert.

Bemerkenswert ist, dass diese Zusammensetzung nur in der CIA-Gruppe mit leichten Schwankungen stabil blieb. Alle anderen Gruppen erhielten eine antibiotische Vorbehandlung und zeigten bei t2 eine Verschiebung hin zu Enterobacteriaceae (CDI:  $43,02 \pm 11,14$ , CDI+CIA:  $41,15 \pm 2,8$  Sham:  $34,08 \pm 17,73$ ), Enterococcaceae (CDI:  $28,58 \pm 13,60$ , CDI+CIA:  $28,82 \pm 15,76$ , Sham:  $25,68 \pm 11,57$ ) und Clostridiaceae (CDI:  $11,48 \pm 16,2$ , CDI+CIA:  $11,77 \pm 8,77$ , Sham:  $2,95 \pm 4,5$ ). Beim dritten Stuhlsammelzeitpunkt (t3), drei Tage nach der Infektion mit *C. difficile* bzw. Bakterienmedium, setzte eine Umkehr in Richtung des ursprünglichen Mikrobioms mit erhöhten Häufigkeiten von Lachnospiraceae (CDI:  $11,48 \pm 16,2$ , CDI+CIA:  $11,77 \pm 8,77$  Sham:  $2,95 \pm 4,5$ ) und Lactobacillaceae (CDI+CIA:  $11,77 \pm 8,77$ , Sham:  $2,95 \pm 4,5$ ) ein. Interessanterweise schien die Infektion mit *C. difficile* die Rückkehr in Richtung des

ursprünglichen Mikrobioms zu beschleunigen, während die Sham-Gruppe über einen längeren Zeitraum Enterococcaceae (CDI:  $8,73 \pm 16,18$ , CDI+CIA:  $1,63 \pm 1,97$ , Sham:  $19,75 \pm 7,64$ ) und Enterobacteriaceae (CDI:  $24,46 \pm 21,97$ , CDI+CIA:  $16,4$  Sham:  $36,66 \pm 17,94$ ) zu großen Anteilen zeigte.

Dieser Trend war bei t4 noch sichtbar, wo Porphyromonadaceae (CDI:16,68 ± 10,10, CDI+CIA: 19,09 ± 6,34, Sham: 8,19 ± 14,15, CIA: 31,33 ± 1,1) und Ruminococcaceae



**Abbildung 13: *C. difficile* beschleunigt die Rückkehr zum ursprünglichen Mikrobiom nach Antibiotikabehandlung.** Die mittleren relativen Häufigkeiten der am häufigsten vorkommenden Bakterienarten in den Stuhlproben der Versuchstiere wurden prozentual mittels gestapelter Balkendiagramme zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten (t1-t5) dargestellt. Die Spezies sind mittels unterschiedlicher Farben gekennzeichnet und in der Farblegende oben beschriftet. Aufgezeigt werden die vier Versuchsgruppen mit folgenden Gruppengrößen: CDI n= 8, sham n= 6, CDI+CIA n=7, CIA n=6.

(CDI: 4,67 ± 5,27, CDI+CIA: 4,99 ± 5,69, Sham: 1,2 ± 1,18, CIA: 4,48 ± 0,05) erhöhte

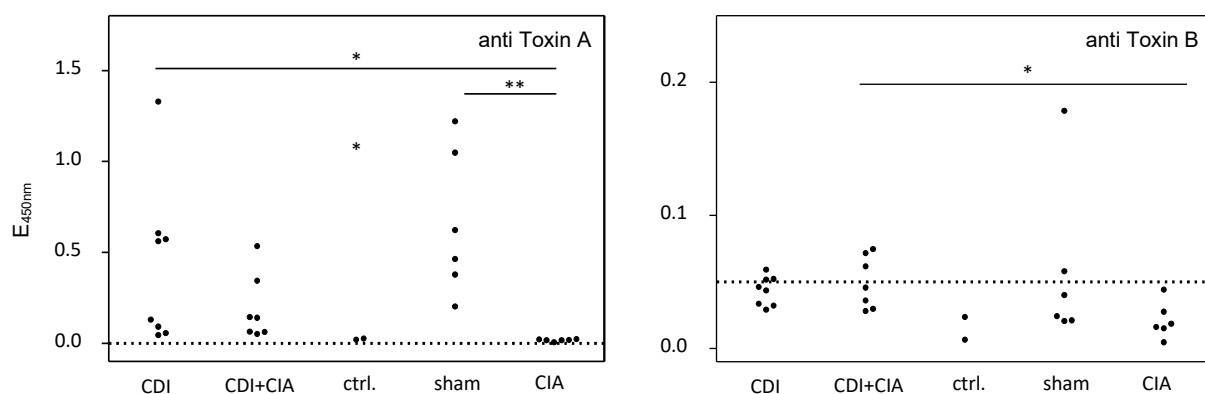


Häufigkeiten in den Gruppen CDI und CDI+CIA aufwiesen, aber noch nicht in der Sham-Gruppe. Bemerkenswert ist, dass das Auftreten von Verrucomicrobiaceae (CDI:  $6,60 \pm 7,62$ , CDI+CIA:  $5,06 \pm 6,39$ , Sham:  $4,39 \pm 2,39$ , CIA:  $0,21 \pm 0,37$ ) bei t5 nur in den Gruppen auftraten, die mit Antibiotika behandelt wurden. Außerdem waren am Ende des Experiments bei t5 in der Gruppe, die mit *C. difficile* infiziert wurden, aber eine geringe Arthritisinzidenz von nur 16,6 % zeigte (CDI+CIA), die Häufigkeiten von Enterobacteriaceae deutlich höher als in der Sham-Gruppe, in der die Arthritisinzidenz 100 % betrug (CDI:  $9,31 \pm 8,37$ , CDI+CIA:  $7,23 \pm 8,32$ , Sham:  $4,37 \pm 7,13$ , CIA:  $0,01 \pm 0,01$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *C. difficile* die Rückkehr zum ursprünglichen Mikrobiom nach der Behandlung mit Antibiotika beschleunigt, wohingegen eine bloße Antibiotikatherapie diesen Prozess verlängert und zu einem neuen Auftreten von Verrucomicrobiae führt. Interessanterweise könnten die durch die Antibiotikabehandlung aufgetretenen Enterobacteriaceae einen protektiven Einfluss auf die Entstehung oder Ausprägung der Arthritis haben.

## 5.7 ANALYSE DER ANTIKÖRPER GEGEN *C. DIFFICILE* TOXIN A UND B AM VERSUCHSENDE

Analog zur Untersuchung des Antikörperstatus gegen *C. difficile* Toxin A und B nach Infektion mit unterschiedlichen Clostridienstämmen, erfolgte diese am Ende des Experiments in allen Versuchsgruppen.



**Abbildung 14: Ähnliche Serumantikörpertiter gegen *C. difficile* Toxin A, wobei CDI+CIA erhöhte Antikörper gegen Toxin B im Hauptversuch zeigt.** Bestimmt wurden die Serumantikörpertiter gegen das *C. difficile* Toxin A und B am Versuchsende mittels ELISA. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus der jeweiligen Gruppe. Die dargestellten Werte wurden bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Dargestellt sind fünf Gruppen, die sich hinsichtlich der Interventionen unterschieden. Die statistische Analyse erfolgte mittels OneWay-ANOVA mit \*=p<0,05, \*\*=p<0,01

Die mit Antibiotika vorbehandelten Mäuse zeigten erhöhte Antikörpertiter und wie erwartet wies die CIA-Gruppe, die keinerlei Antibiotika oder Clostridienbehandlungen erhalten hatte, keine Antikörpertiter auf, ebenso wie die beiden unbehandelten Kontrollmäuse. Die relativen Mittelwerte für die Anti-Toxin A-Antikörper lagen für CDI+CIA bei 0,1920, für Sham bei 0,6563 und für CIA bei 0,01767. Im Oneway-ANOVA und posthoc dunns multiple comparisons test war der Vergleich der P-Werte zwischen CIA und Sham unter 0,01 und CIA und CDI unter 0,05. Bei den Antikörpern gegen das Toxin B lagen die relativen Mittelwerte für CDI bei 0,04356, CDI+CIA bei 0,04975, Sham bei 0,05725, CIA bei 0,00124. Im statistischen Vergleich wiesen alle ein ähnliches Level auf, im Oneway-ANOVA zeigte sich ein statistisch signifikantes Ergebnis zwischen CDI+CIA und CIA mit einem P-Wert unter 0,05. Interessanterweise wiesen alle Mäuse, denen eine antibiotische Vorbehandlung verabreicht wurde, *C. difficile*-Antikörper auf, was darauf hindeutet, dass nicht nur eine Infektion mit *C. difficile*, sondern auch eine Störung der intestinalen Mikrobiota für das Wachstum von *C. difficile* ausreichen könnte. Ähnliche Konzentrationen von Antikörpern gegen *C. difficile* in allen Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Interventionen führen ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass sie keinen Einfluss auf die Entwicklung der Arthritis haben.

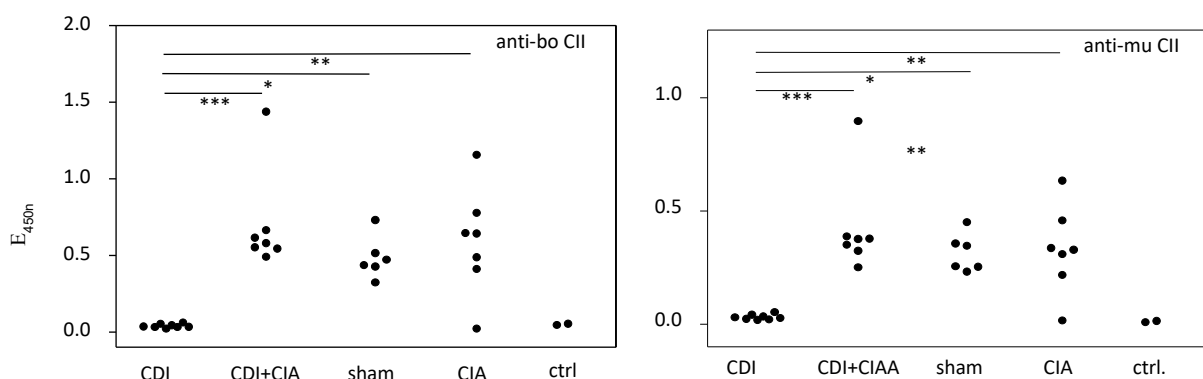
## 5.8 ANALYSE DER ANTIKÖRPER GEGEN BOVINES UND MURINES KOLLAGEN TYP II

Das Ziel der Untersuchung der IgG Antikörper gegen bovines Kollagen Typ II war es einerseits, mithilfe vorhandener Antikörper eine erfolgreiche Immunisierung nachzuweisen. Andererseits war von Interesse, ob die Störungen im Mikrobiom durch die Antibiotikagabe und/oder CDI einen Einfluss auf die Entwicklung dieser Antikörper in Zusammenhang mit der kollagen-induzierten Arthritis haben. Die Antikörper gegen murines Kollagen II entstehen im Sinne eines molekularen Mimikries, wodurch die Immunantwort der Mäuse von der subkutanen Kollagenimmunisation auf die Gelenke übergeht, da dort der höchste Anteil an mauseigenem Kollagen II im Knorpel zu finden ist. Die Analysen erfolgten in Zweifachbestimmung, wobei naive Seren der Stuhlspendermäuse als Hintergrund fungierten. Die abgebildeten Daten stellen die relative Extinktion der Antikörpertiter dar.

Die Mittelwerte der Extinktion der Antikörper gegen bovines Kollagen II betrugen bei der nicht-immunisierten Gruppe CDI 0,04042, sowie den beiden unbehandelten Kontrollmäusen 0,0145. Innerhalb der immunisierten Versuchsgruppen konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede erkannt werden (Mittelwerte der Extinktionen: CDI 0,04042, bei CDI + CIA 0,6988, sham: 0,4849, CIA 0,5926). Die statistischen Auswertungen umfasste einen Oneway-ANOVA mit anschließendem Tukeys Multiple Comparisons Test, die im direkten Vergleich

signifikante Ergebnisse zwischen der nicht immunisierten und den immunisierten Gruppen ergaben: CDI vs. CDI+CIA  $p < 0,001$ , CDI vs. Sham  $p < 0,05$  und CDI vs. CIA mit einem P-Wert  $< 0,01$ . Die Mittelwerte der Extinktion der Antikörper gegen murines Kollagen II ergaben ähnliche Ergebnisse wie gegen bovines Kollagen (CDI 0,03183 und ctrl 0,01167, CDI+CIA 0,4242, sham 0,3163, CIA 0,3292). Auch die statistischen Auswertungen ergaben ähnliche Ergebnisse im direkten Vergleich mittels Oneway-ANOVA: CDI vs. CDI+CIA:  $p < 0,001$ , CDI vs. Sham:  $p < 0,5$  und CDI vs. CIA:  $p < 0,01^{**}$ .

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die nicht immunisierten Versuchsgruppen keine Antikörper gebildet haben. Dies bestätigt, dass zur Antikörperbildung und somit auch Immunantwort mittels Arthritis die Immunisierung mit bovinem Kollagen II nötig ist, wodurch dann im Verlauf der Angriff gegen mauseigenes Kollagen erfolgt. Außerdem schienen die unterschiedlichen Interventionen in den immunisierten Gruppen keinen Einfluss auf die Menge der gebildeten Antikörper zu haben. Innerhalb der immunisierten Gruppen zeigten sich trotz unterschiedlicher Interventionen keine gruppenspezifischen Unterschiede. Weiterhin schien die Ausprägung der Schwere der Arthritis nicht mit der Höhe der gebildeten Antikörper zu korrelieren.

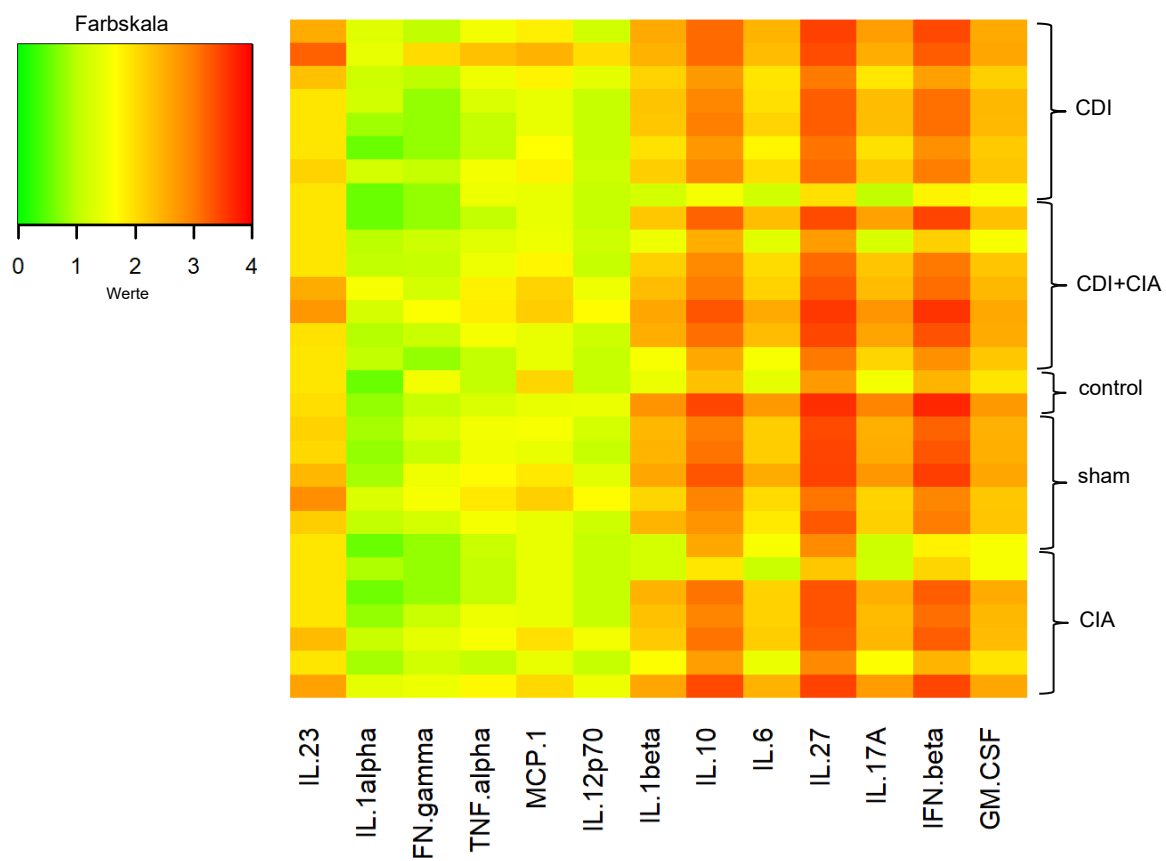


**Abbildung 15: Immunisierte Versuchstiere zeigten vergleichbare Serumantikörper gegen bovines und murines Kollagen II.** Bestimmt wurden die Serumantikörpertiter gegen murines und bovines Kollagen II am Versuchsende mittels ELISA. Dargestellt sind die Werte gemessen als Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus der jeweiligen Gruppe. Dargestellt sind 5 Gruppen, die sich hinsichtlich der Interventionen unterscheiden. Die statistische Analyse erfolgte mittels OneWay-ANOVA mit  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$ ,  $***=p>0,01$ . Anti-bo-CII = Antikörper gegen bovines Kollagen II, anti-mu-CII = Antikörper gegen murines Kollagen II

## 5.9 ANALYSE DER INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINE

Im Serum der Mäuse wurden am Versuchsende verschiedene inflammatorische Marker untersucht, um festzustellen, ob die Antibiotikagabe, die Verabreichung der Bakterien oder die kollagen-induzierte Arthritis einen modulierenden Einfluss auf das Immunsystem

der Mäuse hatte. Mittels Multiplexansatz wurden die Zytokinspiegel von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , MCP-1 und TNF $\alpha$  gemessen, sowie anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Die hier untersuchten Zytokine werden größtenteils vom angeborenen Immunsystem produziert und stellen eine Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptivem Immunsystem dar. Die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IL-17A, IL-23, GM-CSF, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  weisen eine proinflammatorische, IL-10 und IL-27 hingegen eine antiinflammatorische Wirkung auf. IFN $\beta$  wirkt dabei eher antiviral und antiproliferativ und das Zytokin MCP-1 reagiert chemotaktisch auf Monozyten, Basophile und Granulozyten. Am Ende des Beobachtungszeitraumes zeigten alle Versuchsgruppen vergleichbare Zytokinspiegel, die als Heatmap dargestellt sind. Auch eine hierarchische Clusteranalyse ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.



**Abbildung 16: Alle Versuchsgruppen wiesen am Ende der Experimente ähnliche Zytokinspiegel auf.** Die Daten sind in einer Heatmap dargestellt, wobei je ein Tier pro Zeile und je eines der 13 inflammatorischen Zytokine pro Spalte repräsentiert wird. Die abgebildete Farbskala gibt den dekadischen Logarithmus der Massenkonzentration der Zytokine in pg/ml an ( $0 \triangleq 1$  pg/ml,  $1 \triangleq 10$  pg/ml,  $2 \triangleq 100$  pg/ml,  $3 \triangleq 1000$  pg/ml,  $4 \triangleq 10000$  pg/ml). Als Kontrollen diente das Serum zweier unbehandelter Mäuse. Gruppengrößen: *CDI* n=8, *CDI+CIA* n=8, *sham*: n=6, *CIA* n=7. Die hierarchische Clusteranalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

---

## VI. DISKUSSION

---

Das Schleimhautmikrobiom rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis [48], wobei sich herausgestellt hat, dass orale sowie im Darm lebende Mikrobionten den Ausbruch und den Verlauf der Krankheit beeinflussen [43–45]. In dieser Arbeit wurde das murine Modell der kollagen-induzierten Arthritis verwendet und untersucht, ob ein weiteres kommensales Bakterium - *Clostridioides difficile* - die Inzidenz und den Schweregrad der Arthritis beeinflussen würde. Hierfür wurde die DBA/1 x B10.Q F1-Maus, die sich in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe der klinischen Immunologie sehr anfällig für eine kollagen-induzierte Arthritis zeigte [88, 93] und ihre Reaktion auf eine *C. difficile*-Infektion untersucht.

**DBA/1J x B10.Q F1-Mäuse sind empfänglich für eine Infektion mit *C. difficile* und zeigen nach Verabreichung von VPI 10463 die größte Gewichtsabnahme und eine histologisch nachweisbare Darmpathologie.**

Zunächst war das Ziel dieser Arbeit, ein reproduzierbares Modell für die Auslösung beider Erkrankungen – die CDI und RA – im Tiermodell zu etablieren. Um eine nachfolgende Immunisierung zur Induktion der kollagen-induzierten Arthritis zu ermöglichen, war es wichtig, ein Modell zu entwickeln, in dem die Mäuse trotz deutlicher klinischer Symptome vollständig genesen sollten. Da in vorherigen Studien beobachtet werden konnte, dass der Schweregrad der klinischen Symptome der CDI im Mausmodell von der Antibiotikavorbehandlung abhing, wurden die beiden folgenden Modelle zur CDI-Induktion näher beleuchtet [101]. Theriot et al. behandelten C57BL/6 Mäuse 10 Tage mit Cefoperazon, um eine Suszeptibilität hervorzurufen und infizierten sie anschließend mit *C. difficile* [102]. Allerdings wurde in diesem Modell eine signifikante, mindestens sechswöchige cefoperazoninduzierte Störung der Darmflora nachgewiesen [102, 103], was unkalkulierbare Effekte auf die CIA haben könnte. Dieser Effekt war bei dem dreitägigen 5-Antibiotika-Mix und anschließender Clindamycin-Gabe von Chen et al. nach kurzer Zeit ausgeglichen, weshalb die Entscheidung in dieser Arbeit auf besagtes Modell fiel [103, 92]. Da es allerdings noch keine Daten in der Literatur bezüglich der Empfänglichkeit der DBA/1J x B10.Q F1 Maus gegenüber einer CDI gibt, wurde mit diesem Experiment Neuland betreten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von 10<sup>5</sup> KBE des pathogensten *C. difficile*-Stamms VPI 10463 über eine orale Magensonde bei DBA/1 x B10.Q F1-Mäusen zu einem mittleren relativen Gewichtsverlust von über 5 % und Diarrhöen führte. Außerdem konnte bei zwei Mäusen exemplarisch eine offensichtliche histologische Darmentzündung nachgewiesen

werden. Die orale Verabreichung von  $10^5$  KBE der weniger pathogenen Clostridienstämme BI17 und 2K14 korrelierte mit der beschriebenen Pathogenität, was in beiden Fällen eine tendentielle, jedoch nicht signifikante Gewichtsabnahme bedeutete. Die Verabreichung von *C. difficile* Stamm 630 hingegen, der durch eine sehr geringe Toxinproduktion gekennzeichnet ist, führte sogar zu einer leichten signifikanten Gewichtszunahme. Damit ergänzen diese Ergebnisse die früheren Publikationen von Chen et al., die unterschiedliche genetische Anfälligkeiten für *C.-difficile*-Infektionen vorhersagten. Während sich der CD-1-Mausstamm resistent zeigte, waren die C57BL/6-Mäuse sehr anfällig und entwickelten bei einer Verabreichung von  $10^5$  KBE VPI 10463, BI17 und 2K14 gleichermaßen schwere Gewichtsverluste oder verstarben nach kurzer Zeit [92]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die F1-Maus resistenter gegenüber einer Infektion mit VPI 10463 zu sein scheint als die C57BL/6-Mäuse.

Es wird davon ausgegangen, dass eine Infektion des Menschen mit *C. difficile* in erster Linie auf die Exposition gegenüber der Sporenform des Organismus zurückzuführen ist [58]. Eine potenzielle Schwäche dieser Experimente besteht darin, dass die Mäuse mit vegetativen Zellen der Clostridien infiziert wurden. Da Theriot et al zeigen konnten, dass C57BL/6 Mäuse auf eine Infektion mit der gleichen Dosis an Sporen wie vegetativen Zellen mit einer signifikant schwereren Erkrankung reagierten und sich zwei bis vier Tage nach einer Infektion mit VPI 10463 moribund zeigten, wurde oben genanntes Modell verfolgt.

Eine weitere Limitierung der Aussagekraft dieser Arbeit liegt in der unterschiedlichen Aufbereitungsart der verwendeten Clostridienstämme. Da sich erst im Verlauf der Experimente herausstellte, dass die vegetativen Zellen des Stammes VPI 10463 vermutlich während des Einfrierprozess geschädigt wurden, wurden die Versuche mit frisch gezüchteten Bakterien weitergeführt. Auch eine Trennung der Bakterien vom Medium führte zu einer Schädigung, weshalb diese den Mäusen mitsamt Medium verabreicht wurden. Um den etwaigen Effekt des verabreichten Mediums nicht zu vernachlässigen, erhielt die Kontrollgruppe Sham reines Medium anstelle des ursprünglich angedachten Glyzerin/PBS-Gemisches. Es wäre also denkbar, dass das verabreichte Medium das Wachstum anderer in der Darmflora vorhandener Bakterien übermäßig stark gefördert hat. Um einen eventuellen Einfluss des Mediums zu unterbinden, wäre eine weitere Kontrollgruppe nötig gewesen, die nach der Antibiotikavorbereitung beispielsweise PBS über die Magensonde erhält. Für das Monitoring der eingefrorenen Clostridienstämme BI17, 2K14 und 630 wurden die Bakterien ausplattiert und die KBEs gezählt. Hierbei zeigten sich stabile Zahlen. Um eine endgültige Aussage über die Reaktionen der DBA/1J x B10.Q F1-Maus bezüglich einer Infektion mit unterschiedlichen Clostridienstämmen in zukünftigen Experimenten zu treffen, ist die gleiche Verabreichungs- und Aufbereitungsart der Bakterien von äußerster Wichtigkeit.

---

Weiterhin verloren zwei Mäuse nach der Infektion mit VPI 10463 sogar mehr als 15 % ihres ursprünglichen Gewichts, konnten aber durch eine fünftägige Behandlung mit Vancomycin und anschließender fäkaler mikrobieller Transplantation (FMT) kuriert werden. Diese Ergebnisse unterstützen somit die Ergebnisse von Seekatz et al., die darauf hinweisen, dass die FMT das Mikrobiom nach einer *C. difficile*-Infektion effizient wiederherstellen kann [95]. Im Gegensatz dazu führt eine alleinige Vancomycintherapie der CDI laut Warren et al. im Mausmodell bei 62 % zu einem Rückfall [94]. Die Aussagekraft diesbezüglich ist in dieser Arbeit allerdings aufgrund der geringen Anzahl der mit Vancomycin und FMT behandelten Mäusen limitiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Infektion mit *C. difficile* wurden mehrere Analysen durchgeführt. Zum einen erfolgte die Messung der Antikörper im Serum nach Versuchsabschluss. Die Ausprägung der Schwere der Erkrankung sowie die Pathogenität der unterschiedlichen Clostridienstämme schien keinen Einfluss auf die Menge der gebildeten Antikörper zu haben. Da die meisten der Mäuse in dieser Arbeit Antikörper gegen *C. difficile*-Toxin A und B aufwiesen, wurden diese Befunde zunächst als Hinweis auf eine asymptomatische Besiedlung und Bestätigung der Infektion interpretiert. Da jedoch auch in der Sham-Gruppe Anti-Toxin-Antikörper gefunden wurden, wurde die Vorstellung befürwortet, dass die durch die Antibiotikagabe induzierte Störung der Darmflora für das Wachstum und die Toxinproduktion von *C. difficile* ausreichend ist. Dies wiederum impliziert, dass *C. difficile*-Sporen in der Darmflora von Labormäusen vorhanden waren. Auch in der PCR zum Nachweis des *C. difficile* Toxin A-Gens im Stuhl der Mäuse konnte in einer Sham-Gruppe am Tag nach der Mediumgabe ein positiver Bandennachweis erbracht werden. Um das verbleibende Risiko einer Kreuzkontamination der Sporen auszuschließen, wird in zukünftigen Studien eine Typisierung spezifischer *C. difficile*-Stämme erforderlich sein. Interessant bei der Analyse der Antikörpertiter war außerdem, dass der *C. difficile* Stamm 630 signifikant höhere Antikörpertiter gegen Toxin B hervorrief als VPI 10463. In der Literatur konnten dazu keine Evidenzen gefunden werden, sodass eine Erklärung darin liegen könnte, dass dieser Clostridienstamm möglicherweise mehr Toxin B produziert als VPI 10463.

Weiterhin zeigten die Mäuse in allen Gruppen nach der Antibiotikabehandlung einen geringen Gewichtsverlust. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass das Trinkwasser möglicherweise einen veränderten Geschmack durch die Zugabe des Antibiotikagemisches aufwies und die Mäuse daher weniger tranken. Dies ließe sich in Zukunft durch eine Überprüfung der Trinkmenge pro Maus sicherstellen, was außerdem den Vorteil hätte, dass eine Sicherheit über die Menge der aufgenommenen Antibiotika bestünde. Zusätzlich könnte aber auch die intraperitoneale Gabe von Clindamycin aufgrund der Invasivität zu einer vorübergehenden Schwächung der Mäuse geführt haben.

Mit diesen Ergebnissen konnte die Empfänglichkeit der F1 Maus für eine CDI bestätigt, sowie ein funktionierendes *in vivo* Modell zur Untersuchung der CDI in der DBA/1J x B10.Q F1-Maus etabliert werden. Damit erwies sich die erste Hypothese über die Abhängigkeit der Empfänglichkeit einer CDI vom genetischen Hintergrund als bestätigt.

**Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 schwächte die Inzidenz und Stärke der kollagen-induzierten Arthritis ab, wohingegen die alleinige Antibiotikagabe zu einer Verstärkung führte.**

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Feststellung, dass die *C. difficile*-Infektion die Inzidenz und den Schweregrad der kollagen-induzierten Arthritis signifikant reduziert hat. Die vor der CIA mit *C. difficile* infizierte Gruppe (CDI+CIA) zeigte nur eine Inzidenz von 16 % und einen mittleren Arthritiscore von 3,9. Im Gegensatz dazu lagen die Inzidenzen der beiden Kontrollgruppen bei 60 % in der CIA-Gruppe und bei 100 % in der Sham-Gruppe, die vor der CIA nur eine Antibiotikabehandlung aber keine Infektion erhalten hatte. Die mittleren Scores lagen bei 7,33 in der CIA, sowie 15,5 in der Sham-Gruppe.

Hiermit wurde also die zweite Hypothese, „eine vorhergehende Infektion mit *C. difficile* führt zu einer Verstärkung der kollagen-induzierten Arthritis“, widerlegt. Wenn auch unerwartet, wurden ähnliche Ergebnisse von Hablot et al. beschrieben, die eine Verzögerung und einen reduzierten Schweregrad der nachfolgenden CIA nach Dextran-Natriumsulfat-induzierter Colitis im Mausmodell zeigten [104]. Es kann nur spekuliert werden, dass der Verlust der Barrierefunktion im Darm - wie durch das *C. difficile*-Toxin provoziert - zu einer systemischen Entzündung führen könnte. Diese wiederum könnte entweder das Immunsystem von Reaktionen auf die Gelenke ablenken, das Zytokinprofil in Richtung eines gelenkschützenden Milieus umkehren oder regulatorische T-Zellen induzieren, die Autoimmunreaktionen verhindern. Da hier Blut und Serum erst am Versuchsende entnommen wurden, können diese Ergebnisse noch nicht auf zellulärer oder molekularer Ebene erklärt werden. Die Zytokinmessungen im Serum am Versuchsende zeigten allerdings keine gruppenspezifischen Unterschiede.

Von anfänglichen Spekulationen darüber, dass der alleinige Kontakt mit *C. difficile* ohne nachfolgende Infektion möglicherweise ausreichend sein könnte für die Beeinflussung der Ausprägung der Arthritis, wurde Abstand genommen. Die abschwächenden Effekte der CDI auf die CIA konnten nur bei einer Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 bestätigt werden, nicht jedoch bei den weniger pathogenen Stämmen 2K14 und BI17, bei denen die Infektion symptomlos verlief. Im Gegenteil – diese zeigten vergleichbare Inzidenzen der Arthritis von 60-80 % wie die nicht mit *C. difficile* infizierte Kontrollgruppe. Diese Erkenntnisse wurden in



weiteren Experimenten, die auf dieser Arbeit basieren, in der Arbeitsgruppe für klinische Immunologie der Universität Rostock nachgewiesen und sind in einer gemeinsamen Publikation dargestellt [105].

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit unerwartet sind, gibt es sporadisch Veröffentlichungen, die in eine ähnliche Richtung weisen. Atarashi et al. zeigten beispielsweise, dass die Besiedlung von Mäusen mit einer Mischung aus mehreren Clostridienstämmen eine Umgebung bot, die reich an transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  war und die FoxP3-positive  $T_{reg}$ -Anzahl und -funktion im Dickdarm positiv beeinflusste [106]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass kleinkettige Fettsäuren wie Butyrat, die von Clostridien produziert werden, die Differenzierung von  $T_{regs}$  induzieren [107]. Ähnliche Ergebnisse konnte auch in der eben genannten Arbeit gezeigt werden [105]. Dort ergaben RT-PCR-Analysen der mesenterialen Lymphknoten von VPI 10463-infizierten Mäusen eine Zunahme FoxP3-positiver Zellen, die mit einer Zunahme von Gata3 einherging, was auf ein nicht entzündliches  $T_{reg}$ - $Th_2$ -Milieu hindeutet. Ob kleinkettige Fettsäuren tatsächlich direkt  $T_{reg}$ -Zellen induzieren oder ob sie die Produktion von *C. difficile*-Toxin A und B fördern und damit indirekt die  $T_{reg}$ -Induktion begünstigen, muss noch untersucht werden [108]. Dieser Effekt konnte allerdings nur bei Mäusen beobachtet werden, die sich spontan von einer VPI 10463-Infektion erholten. Die Behandlung der CDI mit Vancomycin und FMT führte zu einem völlig anderen Mesenterialmilieu, wobei die Foxp3-Expression mit Tbx21 korrelierte, was auf eine  $T_{reg}$ -Polarisation in Richtung  $Th_1$  hindeutet. Auch wenn die plastische Differenzierung von  $T_{reg}$ -Zellen häufig nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Progression von Krankheiten spielen, erlauben diese RNA-Analysen keine klare Unterscheidung zwischen Populationen von  $Th_2$ -,  $Th_1$ - oder  $T_{reg}$ -Zellen einerseits und der Plastizität unter  $T_{regs}$  andererseits [109]. Darüber hinaus gab es noch keinen Beweis dafür, dass  $Th_2$  oder  $T_{reg}$  vom Darm in die Gelenke wanderten und zur Verhinderung der Arthritis beitrugen, doch die lindernde Wirkung der VPI 10463-Infektion auf die CIA unterstützt die These einer Darm-Gelenk-Achse.

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es widersprüchliche Publikationen gibt. Beispielsweise berichteten Wu et al, dass die Besiedlung von keimfreien K/BxN-Mäusen mit segmentierten filamentösen Bakterien (SFB) der Bakterienfamilie *Clostridiaceae* die Entwicklung von  $Th_{17}$ , die Produktion von krankheitsauslösenden Autoantikörpern und den beschleunigten Ausbruch einer Arthritis induzierte [87]. Ivanov et al konnten bestätigen, dass die Besiedlung des Darms mit SFB zu einer erhöhten Expression von  $Th_{17}$  Zellen führte [110].  $Th_{17}$ -Zellen werden mit der Entstehung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht.

Weiterhin zeigten alle immunisierten Gruppen dieser Experimente unabhängig vom Infektionsstatus vergleichbare Antikörpertiter gegen Kollagen Typ II. Anfangs bestand der Verdacht, dass eine CDI möglicherweise zu einer Verstärkung der Arthritis führen könnte, wie dies bei einer Parodontitis, ausgelöst durch *P. gingivalis* der Fall ist [88]. *P. gingivalis* exprimiert als bisher einzig bekannte, pathogene Bakterienspezies das Enzym Peptidylarginindeminase (PAD), das zur Citrullinierung von Proteinen und im Verlauf durch molekulare Mechanismen zur Antigen-Erzeugung führt und die autoimmune Antwort der RA triggern kann [111]. In einer Arbeitsgruppe in Rostock konnte in einer vergleichenden Proteinsequenzanalyse eine Übereinstimmung zwischen der PAD von *P. gingivalis* und den entsprechenden Proteinen zweier Clostridienstämme - *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* - gefunden werden. Diese Übereinstimmung erstreckte sich über das aktive Zentrum der PAD und deutete darauf hin, dass Clostridien ebenfalls über eine PAD verfügen und somit zur Citrullinierung befähigt sein könnten. Da sich im Verlauf der Versuche aber genau entgegengesetzte Ergebnisse zeigten, nämlich eine Abschwächung der Arthritis durch eine CDI, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Durch die vergleichbaren Antikörpertiter gegen Kollagen II lässt sich somit lediglich eine Aussage über eine erfolgreiche Immunisierung treffen.

### **Perturbationen im Mikrobiom durch eine Antibiotikagabe und/oder Infektion mit *C. difficile* beeinflussen Inzidenz und Schwere der CIA**

Die Analyse des Darmmikrobioms zu mehreren Zeitpunkten im Verlauf der Experimente gestattete über dessen Auswirkungen zu spekulieren. Allerdings muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Mikrobiomanalysen pro Käfig durchgeführt wurden und daraus im Verlauf Mittelwerte gebildet wurden. Aus diesen Daten lassen sich also Tendenzen ableiten, jedoch keine definitiven Aussagen über die Zusammensetzungen der Darmflora einzelner Mäuse treffen. Da die CIA-Gruppe, in der die Mäuse ohne vorherige Infektion oder Antibiotikabehandlung nur immunisiert wurden, während der 14 Versuchswochen ein sehr stabiles Mikrobiom zeigte, ist es eher unwahrscheinlich, dass der Beginn der CIA notwendigerweise von einer Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung abhängig ist. Andererseits lassen die Daten dieser Studie Raum für Spekulationen, dass das Darmmikrobiom einen Einfluss auf die Entwicklung der CIA hat. Im Gegensatz zu den Gruppen, die mit *C. difficile* (CDI und CIA+CDI) infiziert waren, zeigte die Sham-Gruppe, die eine Arthritisinzidenz von 100 % aufwies, längere und hohe Häufigkeiten von Enterobacteriaceae und Enterokokken bei t4 und t5.

Tatsächlich ist *Escherichia coli* als Zugehöriger der Enterobakterien einer der "üblichen Verdächtigen", der häufig an der Pathogenese der Autoimmunität beteiligt ist [112]. Ebenso wurde kürzlich *Proteus mirabilis* als der mikrobielle Hauptverantwortliche für die Verursachung

---

der RA beschrieben, wobei die mechanistische Verbindung zwischen dem Bakterium und der menschlichen Krankheit ein molekulares Mimikry impliziert [45]. Rogier et al. konnten auch nachweisen, dass die relative Häufigkeit von Proteobakterien nach der CIA-Immunisierung signifikant zunimmt. Weiterhin zeigte diese Gruppe, dass *Firmicutes* in der präklinischen Phase der Arthritis dominiert, wohingegen die relative Häufigkeit von *Bacteroidetes* abnimmt [113]. Die hier gezeigten Daten unterstützen daher die Vorstellung, dass Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung für die Induktion der Arthritis nicht zwingend erforderlich sind, ihre Entwicklung jedoch begünstigen können.

Die Idee, dass eine antibiotische Behandlung für eine Autoimmunität prädisponiert, hat in letzter Zeit an Dynamik gewonnen. Yang et al. berichteten bereits über eine höhere Inzidenz und einen höheren Schweregrad von CIA bei Mäusen, die mit Clindamycin, aber nicht mit Vancomycin behandelt wurden [114]. Dies wurde auch in diesem Experiment bestätigt, da die Sham-Gruppe, die unter anderem mit Clindamycin behandelt wurde, erhöhte Arthritiscores und -inzidenzen zeigte. Ebenso zeigten Maeda et al., dass die Dysbiose bei Arthritisgefährdeten SKG-Mäusen über die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im Darm zur Gelenkentzündung beiträgt. Sie behaupteten, dass der Darm ein Ort der initialen T-Zell-Aktivierung ist, und folgerten, dass die Mikrobiota des Darms angeborene Darm-Immunzellen aktivieren können, die wiederum T-Zellen stimulieren, um die Autoreaktivität der Gelenke in SKG-Mäusen zu verstärken [115].

Interessanterweise wurde in dieser Arbeit auch beobachtet, dass eine *C. difficile*-Infektion die Umkehr zum ursprünglichen Mikrobiom zu beschleunigen schien und diese mit einem schnellen Anstieg der *Lachnospiraceae* nach Beendigung der Antibiotikatherapie verbunden war. Mitglieder der *Lachnospiraceae* sind in der Lage, komplexe Kohlenhydrate zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) zu vergären, und diese wurden als wichtig für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase erachtet [116–118]. Es wurde z.B. gezeigt, dass SCFA das Wachstum von *C. difficile* in vitro hemmen und die Toxinproduktion verringern [119]. Es ist daher möglich, dass die vorübergehende Besiedlung des Darms mit *C. difficile* und der schnelle Ersatz durch *Lachnospiraceae* in der Folge das Auftreten von "pro-arthritogenen" Bakterien verzögerte.

## VII. FAZIT

---

Zusammenfassend wurde hier zum ersten Mal eine Infektion mit *C. difficile* und eine kollagen-induzierte Arthritis in der Maus *in vivo* kombiniert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *C. difficile* eine Entzündung des Darms auslöste, die vor einer späteren Arthritis-Entwicklung schützte. Die Studie hat jedoch ihre Grenzen. Es ist nicht möglich zu unterscheiden, ob es die mikrobiellen Veränderungen sind, die zum Schutz vor Arthritis beitragen, oder ob die Mobilisierung und/oder Polarisierung von Immunzellen in Richtung einer Darmentzündung die Entwicklung einer Gelenkerkrankung verhindert hat. Es wird daher in zukünftigen Experimenten äußerst wichtig sein, die Verteilung von mukosalen und systemischen Th17- und T<sub>reg</sub>-Zellen besser zu beurteilen. Leider ergaben sich durch die durchflusszytometrisch gemessenen Zytokine am Ende des Versuchs keine Hinweise auf einen bakterienspezifischen Einfluss. Bedeutsam wäre es daher, durch mehrmalige Blutentnahmen im Verlauf die Zytokinantwort im Serum zu analysieren. Ebenso von Wichtigkeit wären detailliertere Mikrobiomanalysen einzelner Mäuse zu mehreren Zeitpunkten, besonders während der Entstehung der CIA. Die Aussicht auf mögliche therapeutische Vorteile, die sich aus Infektionen mit *C. difficile* ergeben, erfordert weitere Forschungsarbeiten, die bei der Aufklärung der genauen Mechanismen helfen.

**VIII. LITERATURVERZEICHNIS**

---

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; (388):2023–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
2. Sokolove J, Strand V. Rheumatoid arthritis classification criteria - It's finally time to move on! *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 2010;68(3):232-8. Epub 2010/10/26.
3. Ostrowska M, Maśliński W, Prochorec-Sobieszek M, Nieciecki M, Sudot-Szopińska I. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis. *Reumatologia* 2018; 56(2):111–20. <https://doi.org/10.5114/reum.2018.75523>
4. Soubrier M, Barber CN, Tatar Z, Couderc M, Dubost JJ, Mathieu S. Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Joint bone spine* 2014; 81(4). <https://doi.org/10.1177/1759720X16643340>
5. E. Marcucci. Extra-articular rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2018; 70:212–24. <https://doi.org/10.4081/reumatismo.2018.1106>
6. Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M et al. The Prevalence of Rheumatoid Arthritis in the United Kingdom: New Estimates for a New Century. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41(7). <https://doi.org/10.1093/rheumatology/41.7.793>
7. Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in Incidence and Mortality in Rheumatoid Arthritis in Rochester, Minnesota, Over a Forty-Year Period. *Arthritis and Rheumatism* 2002; 46(3). <https://doi.org/10.1002/art.509>
8. Pedersen JK, Svendsen AJ, Hørslev-Petersen K. Incidence of Rheumatoid Arthritis in the Southern Part of Denmark From 1995 to 2001. *The Open Rheumatology Journal* 2007; 1: 18-23. <https://doi.org/10.2174/1874312900701010018>
9. David L Scott, Frederick Wolfe, Tom WJ Huizinga. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2010; 376(9746):1094–108. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60826-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60826-4)
10. Chancay MG, Guendeschadze SN, Blanco I. Types of Pain and Their Psychosocial Impact in Women With Rheumatoid Arthritis. *Women's midlife health* 2019; 5 (3). 2-9. <https://doi.org/10.1186/s40695-019-0047-4>
11. Spector TD. Rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1990; 16(3):513–37. Epub 1990/08/01
12. Furneri, Mantovani LG, Belisari A, Mosca M, Cristiani M, Bellelli S, Cortesi PA, Turchetti G. Systematic literature review on economic implications and pharmacoeconomic issues of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2012; 30(4 Suppl 73):72–84. Epub 2012 Oct 22
13. Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48(7):1771–4. <https://doi.org/10.1002/art.11156>
14. Cush JJ. Early Rheumatoid Arthritis -- Is There a Window of Opportunity? *The Journal of rheumatology. Supplement* 2007; 80. Epub 2007/11/01

15. van der Kooij SM, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Ewals JA, Han KH, Hazes JM et al. Patient-reported Outcomes in a Randomized Trial Comparing Four Different Treatment Strategies in Recent-Onset Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2009; 61(1):4-12. <https://doi.org/10.1002/art.24367>
16. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedfeld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatology*. 2000;43(1):155-63. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3)
17. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010; 69(9). 1580-8. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>
18. Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M et al. Autoantibody Profiling as Early Diagnostic and Prognostic Tool for Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005; 64(12). 1731-6. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.035691>
19. Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated Peptide Antibody Assays and Their Role in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2009; 61(11):1472-83. <https://doi.org/10.1002/art.24827>
20. Engelmann R, Müller-Hilke B. Antibodies Against Citrullinated Peptides in Clinical Practice and Research. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2009; 68(6): 485-90. <https://doi.org/10.1007/s00393-009-0494-7>
21. Rönnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L et al. Longitudinal Analysis of Citrullinated Protein/Peptide Antibodies (anti-CP) During 5 Year Follow Up in Early Rheumatoid Arthritis: Anti-CP Status Predicts Worse Disease Activity and Greater Radiological Progression. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005; 64(12). 1744-9. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.033571>
22. Pianta A, Arvikar SL, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE et al. Two Rheumatoid Arthritis-Specific Autoantigens Correlate Microbial Immunity With Autoimmune Responses in Joints. *The Journal of clinical investigation* 2017; 127(8): 2946-2956. <https://doi.org/10.1172/JCI93450>
23. Versteeg GA, Steunebrink LMM, Vonkeman HE, Ten KPM, van dBA, van dLM. Long-term Disease and Patient-Reported Outcomes of a Continuous Treat-To-Target Approach in Patients With Early Rheumatoid Arthritis in Daily Clinical Practice. *Clinical rheumatology* 2018; 37(5):1189-1197. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3962-5>
24. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M et al. EULAR Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis With Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2016 Update. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2017; 76(6):960-977. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210715>
25. Weseloh C, Schneider M, Specker Ch. S3 Leitlinie AWMF: Frühe Rheumatoide Arthritis-Management.060-002I. 2019. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/060-002I\\_S3\\_Fruehe\\_Rheumatoide-Arthritis-Management\\_2019\\_12\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-002I_S3_Fruehe_Rheumatoide-Arthritis-Management_2019_12_01.pdf)
26. S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012; 2016.000Z. [https://dgrh.de/dam/jcr:f887ba34-f7fc-4a6f-bf55-dde42aacb25c/leitlinie\\_s1\\_medikamentoes\\_therapie\\_ra.pdf](https://dgrh.de/dam/jcr:f887ba34-f7fc-4a6f-bf55-dde42aacb25c/leitlinie_s1_medikamentoes_therapie_ra.pdf)

27. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New Therapies for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Lancet* (London, England) 2007; 370(9602):1861-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60784-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60784-3)
28. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzehi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H et al. Strategies Toward Rheumatoid Arthritis Therapy; The Old and the New. *Journal of cellular physiology* 2019; 234(7):10018-10031. <https://doi.org/10.1002/jcp.27860>
29. Krüger K. Biologika als Therapie der ersten Wahl bei rheumatoider Arthritis - Contra. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2005; 130(33):1901. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871918>
30. Burmester GR, Pope JE. Novel Treatment Strategies in Rheumatoid Arthritis. *Lancet* (London, England) 2017; 389(10086):2338-2348. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31491-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31491-5)
31. Oliver JE, Worthington J, Silman AJ. Genetic Epidemiology of Rheumatoid Arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 2006; 18(2):141-6. <https://doi.org/10.1097/01.bor.0000209425.84775.23>
32. Terao C, Brynedal B, Chen Z, Jiang X, Westerlind H, Hansson M et al. Distinct HLA Associations With Rheumatoid Arthritis Subsets Defined by Serological Subphenotype. *American journal of human genetics* 2019; 105(3):616-624. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.08.002>
33. Bellucci E, Terenzi R, La Paglia GM, Gentileschi S, Tripoli A, Tani C, Alunno A. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2016; 34(5):793–801. Epub 2016/09/16.
34. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette Smoking Increases the Risk of Rheumatoid Arthritis. Results From a Nationwide Study of Disease-Discordant Twins. *Arthritis and Rheumatism* 1996; 39(5):732-5. <https://doi.org/10.1002/art.1780390504>
35. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A et al. Impact of Smoking as a Risk Factor for Developing Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010; 69(1):70-81. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.096487>
36. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. Smoking and Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences* 2014; 15(12): 22279-95. <https://doi.org/10.3390/ijms151222279>
37. Feng X, Xu X, Shi Y, Liu X, Liu H, Hou H et al. Body Mass Index and the Risk of Rheumatoid Arthritis: An Updated Dose-Response Meta-Analysis. *Biomed Research International* 2019; 2019: 3579081. <https://doi.org/10.1155/2019/3579081>
38. Armstrong DJ, McCausland EM, Quinn AD, Wright GD. Obesity and Cardiovascular Risk Factors in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 2006; 45(6):782. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei124>
39. Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, Calvo-Alén J, Hørslev-Petersen K, Luukkainen RK et al. Cardiovascular Disease in Patients With Rheumatoid Arthritis: Results From the QUEST-RA Study. *Arthritis Research and Therapy* 2008; 10(2). <https://doi.org/10.1186/ar2383>

- 
40. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in Autoimmune Diseases: Not a Passive Bystander. *Autoimmunity reviews* 2014; 13(9):981-1000. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.07.001>
  41. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* 2017; 46(2):183–96. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
  42. Silman AJ. Is rheumatoid arthritis an infectious disease? *British Medical Journal* 1991; 303(6796):200–1. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6796.200>.
  43. de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *The Journal of Rheumatology*. 2008; 35(1):70–6. Epub 2007/11/15
  44. Newkirk MM, Zbar A, Baron M, Manges AR. Distinct bacterial colonization patterns of *Escherichia coli* subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(7):1311–6. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq088>
  45. Ebringer A, Rashid T, Wilson C. Rheumatoid arthritis, *Proteus*, anti-CCP antibodies and Karl Popper. *Autoimmunity Reviews* 2010; 9(4):216–23. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.10.006>
  46. Hemmer B, Vergelli M, Gran B, Ling N, Conlon P, Pinilla C et al. Predictable TCR Antigen Recognition Based on Peptide Scans Leads to the Identification of Agonist Ligands With No Sequence Homology. *The Journal of Immunology* 1998; 160(8): 3631-6
  47. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Current Opinion in Rheumatology* 2014; 26(1):101–7. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000008>
  48. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research* 2017; 2017:4835189. <https://doi.org/10.1155/2017/4835189>
  49. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 2009; 31(3):368–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.009>
  50. Vaahtovuori J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P. Fecal Microbiota in Early Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* August 2008; 35(5):1500–5. Epub 2008/06/01
  51. Kyne Lorraine, Warny Michel, Qamar Amir, Kelly Ciarán P. Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *The New England journal of medicine* 2000; 342(6): 390-7. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002103420604>
  52. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, Mulligan ME, Silva J Jr. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1995 Aug; 16(8):459–77. <https://doi.org/10.1086/648363>
  53. Verity P, Wilcox MH, Fawley W, Parnell P. Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *The journal of hospital infection* 2001. 49(3):204–9. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1078>
-



- 
54. al Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology*. 1996 Aug; 45(2):133-7. <https://doi.org/10.1099/00222615-45-2-133>
  55. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998. Suppl C:47-57. [https://doi.org/10.1093/jac/41.suppl\\_3.47](https://doi.org/10.1093/jac/41.suppl_3.47)
  56. LaMont JT, Kelly CP. *Clostridium difficile* infection. *Annual review of medicine* 1998; 49:375-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.49.1.375>
  57. Hecht G, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. *Clostridium Difficile* Toxin A Perturbs Cytoskeletal Structure and Tight Junction Permeability of Cultured Human Intestinal Epithelial Monolayers. *The Journal of clinical investigation* 1988; 82(5):1516-24. <https://doi.org/10.1172/JCI113760>
  58. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology* 2009. 7(7): 526-36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>
  59. Hurley BW, Nguyen CC. The Spectrum of Pseudomembranous Enterocolitis and Antibiotic-Associated Diarrhea. *Archives of internal medicine* 2002; 162(19):2177-84. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.19.2177>
  60. P  pin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *Canadian Medical Association Journal* 2005; 173(9):1037-42. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050978>
  61. Klein EY, van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceeding of the national academy of Sciences of USA* 2018; 115(15):E3463-E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
  62. Elliott B, Chang BJ, Golledge CL, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Internal Medicine Journal* 2007 Aug; 37(8):561-8. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2007.01403.x>
  63. Kounatidis D, Vadiaka M, Kouvidou C, Sampaziotis D, Skourtis A, Panagopoulos F et al. *Clostridioides Difficile* Infection in a Patient With Immunoglobulin A Vasculitis: A Triggering Factor or a Rare Complication of the Disease? A Case-Based Review. *Rheumatology international* 2020; 40(6). 997-1000. <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04586-5>
  64. Hung Y-P, Tsai P-J, Hung K-H, Liu H-C, Lee C-I, Lin H-J et al. Impact of toxigenic *Clostridium difficile* colonization and infection among hospitalized adults at a district hospital in southern Taiwan. *PLoS ONE* 2012; 7(8):e42415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042415>
  65. Hung Y-P, Lin H-J, Wu T-C, Liu H-C, Lee J-C, Lee C-I et al. Risk factors of fecal toxigenic or non-toxigenic *Clostridium difficile* colonization: impact of Toll-like receptor polymorphisms and prior antibiotic exposure. *PLoS ONE* 2013; 8(7):e69577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069577>
  66. Alasmari F, Seiler SM, Hink T, Burnham C-AD, Dubberke ER. Prevalence and risk factors for asymptomatic *Clostridium difficile* carriage. *Clinical Infectious Diseases* 2014; 59(2):216-22. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu258>
-

- 
67. Walker KJ, Gilliland SS, Vance-Bryan K, Moody JA, Larsson AJ, Rotschafer JC, Guay DR. Clostridium difficile colonization in residents of long-term care facilities: prevalence and risk factors. *Journal of the American Geriatrics Society* 1993; 41(9):940–6. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1993.tb06759.x>
  68. Maseda D, Zackular JP, Trindade B, Kirk L, Roxas JL, Rogers LM et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Alter the Microbiota and Exacerbate Clostridium difficile Colitis While Dysregulating the Inflammatory Response. *MBio* 2019; 10(1):e02282-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02282-18>
  69. Solomon K. The host immune response to Clostridium difficile infection. *Therapeutic Advances in Infectious Diseases* 2013; 1(1):19–35. <https://doi.org/10.1177/2049936112472173>
  70. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *The New England journal of medicine* 1978; 298(10):531-4. <https://doi.org/10.1056/NEJM197803092981003>
  71. Sánchez-Hurtado K, Corretge M, Mutlu E, McIlhagger R, Starr JM, Poxton IR. Systemic antibody response to Clostridium difficile in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57(Pt 6):717–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47713-0>
  72. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England journal of medicine* 2002; 346(5):334–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp011603>
  73. Bignardi GE. Risk Factors for Clostridium Difficile Infection. *The Journal of hospital infection* 1998; 40(1):1-15. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(98\)90019-6](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(98)90019-6)
  74. Eze P, Balsells E, Kyaw MH, Nair H. Risk factors for Clostridium difficile infections – an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. *Journal of global health*; 7(1). <https://doi.org/10.7189/jogh.07.010417>
  75. Kuijper EJ, van Dissel JT. Spectrum of Clostridium difficile infections outside health care facilities. *Canadian Medical Association Journal* 2008; 179(8):747–8. <https://doi.org/10.1503/cmaj.081211>
  76. RKI: Clostridium difficile-assoziierte Diarrhö: zunehmende Inzidenz in Deutschland, *Epidemiologisches Bulletin* 2008. 15:119. <https://doi.org/10.25646/4337>
  77. Silva J. Clostridium Difficile Nosocomial Infections--Still Lethal and Persistent. *Infection control and hospital epidemiology* 1994; 15(6):368-70. <https://doi.org/10.1086/646933>
  78. Kelly CP, LaMont JT. Clostridium Difficile Infection. *Annual review of medicine* 1998; 49:375-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.49.1.375>
  79. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P. Emergence of Clostridium Difficile-Associated Disease in North America and Europe. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2006; 12 Suppl 6:2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x>
  80. Vonberg RP, Schwab F, Gastmeier P. Clostridium Difficile in Discharged Inpatients, Germany. *Emerging infectious diseases* 2007; 13(1):179-80. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060611>
-

- 
81. Martínez-Meléndez A, Camacho-Ortiz A, Morfin-Otero R, Maldonado-Garza HJ, Villarreal-Treviño L, Garza-González E. Current Knowledge on the Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *World journal of gastroenterology* 2017; 23(9):1552-1567. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i9.1552>
  82. Crobach MJT, Baktash A, Duszenko N, Kuijper EJ. Diagnostic Guidance for *C. Difficile* Infections. *Advances in experimental medicine and biology* 2018; 1050:27-44. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_3)
  83. Guh AY, Kutty PK. *Clostridioides Difficile* Infection. *Annals of internal medicine* 2018; 169(7):ITC49-ITC64. <https://doi.org/10.7326/AITC201810020>
  84. Guery B, Galperine T, Barbut F. *Clostridioides difficile*: Diagnosis and Treatments. *BMJ (Clinical research ed.)* 2019; 366:l4609. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4609>
  85. Xu H, Liu M, Cao J, Li X, Fan D, Xia Y et al. The Dynamic Interplay between the Gut Microbiota and Autoimmune Diseases. *Journal of immunology research* 2019; 2019:7546047. <https://doi.org/10.1155/2019/7546047>
  86. Fredrik Backhed, Ruth E. Ley, Justin L. Sonnenburg, Daniel A. Peterson, Jeffrey I. Gordon. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 2005; 307(5717):1915–20. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
  87. Wu H-J, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010; 32(6):815–27. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.001>
  88. Ebbers M, Lübcke PM, Volzke J, Kriebel K, Hieke C, Engelmann R et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Scientific Reports* 2018; 8(1):15129. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33129-z>
  89. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced Arthritis as an Animal Model for Rheumatoid Arthritis: Focus on Interferon- $\gamma$ . *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2011; 31(12):917-26. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0056>
  90. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced Arthritis. *Nature Protocols* 2007; 2(5). 1269-75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>
  91. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* 2003; 25(1):3–18. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0127-1>
  92. Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, Nanthakumar N, Cheknis A, Gerding DN et al. A Mouse Model of *Clostridium difficile*–Associated Disease. *Gastroenterology* 2008; 135(6):1984–92. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>
  93. Engelmann R, Müller-Hilke B. Experimental silicosis does not aggravate collagen-induced arthritis in mice. *Journal of negative results in biomedicine* 2017; 16(1):5. <https://doi.org/10.1186/s12952-017-0071-6>
  94. Warren CA, van Opstal EJ, Riggins MS, Li Y, Moore JH, Kolling GL et al. Vancomycin treatment's association with delayed intestinal tissue injury, clostridial overgrowth, and recurrence of *Clostridium difficile* infection in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; 57(2):689–96. <https://doi.org/10.1128/AAC.00877-12>
-

- 
95. Seekatz AM, Theriot CM, Molloy CT, Wozniak KL, Bergin IL, Young VB. Fecal Microbiota Transplantation Eliminates *Clostridium difficile* in a Murine Model of Relapsing Disease. *Infection and Immunity* 2015; 83(10):3838–46. <https://doi.org/10.1128/IAI.00459-15>
  96. Am Seekatz, Aas J, Gessert CE, Rubin TA, Saman DM, Bakken JS et al. Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation. *MBio* 2014; 5(3):e00893-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00893-14>
  97. Bialkowska AB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. Improved Swiss-rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses. *Journal of visualized experiments* 2016; (113):54161. <https://doi.org/10.3791/54161>
  98. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 2009; 75(23):7537–41. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
  99. Jafari NV, Kuehne SA, Bryant CE, Elawad M, Wren BW, Minton NP et al. *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism(s). *PLoS ONE* 2013; 8(7):e69846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069846>
  100. Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan VK, Johnson S et al. Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *Journal of bacteriology* 2010; 192(19):4904–11. <https://doi.org/10.1128/JB.00445-10>
  101. Castro-Córdova P, Díaz-Yáñez F, Muñoz-Miralles J, Gil F, Paredes-Sabja D. Effect of antibiotic to induce *Clostridioides difficile*-susceptibility and infectious strain in a mouse model of *Clostridioides difficile* infection and recurrence. *Anaerobe* 2020; 62:102149. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102149>
  102. Theriot CM, Koumpouras CC, Carlson PE, Bergin, II, Aronoff DM, Young VB. Cefoperazone-treated Mice as an Experimental Platform to Assess Differential Virulence of *Clostridium Difficile* Strains. *Gut Microbes* 2011; 2(6):326-34. <https://doi.org/10.4161/gmic.19142>
  103. Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, Young VB. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 2011; 2(3):145–58. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16333>
  104. Hablot J, Peyrin-Biroulet L, Kokten T, El Omar R, Netter P, Bastien C et al. Experimental colitis delays and reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *PLoS ONE* 2017; 12(9):e0184624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624>
  105. Schmidt CJ, Wennendorf K, Ebbers M, Volzke J, Müller M, Strübing J et al. Infection With *Clostridioides difficile* Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. *Frontiers in Immunology* 2020; 11:571049. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571049>
  106. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species. *Science* 2011; 331(6015):337–41. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
-

107. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D et al. Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T Cells. *Nature* 2013; 504(7480):446-50. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
  108. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuisper EJ. Clostridium difficile infection. *Nature reviews. Disease Primers* 2016; 2:16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
  109. Attias M, Al-Aubodah T, Piccirillo CA. Mechanisms of human FoxP3+ Treg cell development and function in health and disease. *Clinical and experimental immunology* 2019; 197(1):36–51. <https://doi.org/10.1111/cei.13290>
  110. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009; 139(3):485–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
  111. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rh. arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2010 Sep;62(9):2662-72. <https://doi.org/10.1002/art.27552>
  112. Bogdanos DP, Sakkas LI. From Microbiome to Infectome in Autoimmunity. *Current Opinion in Rheumatology* 2017; 29(4): 369-373. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000394>
  113. Rogier R, Evans-Marin H, Manasson J, van der Kraan, Peter M, Walgreen B, Helsen MM et al. Alteration of the intestinal microbiome characterizes preclinical inflammatory arthritis in mice and its modulation attenuates established arthritis. *Scientific Reports* 2017; 7(1):15613. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15802-x>
  114. Yang S, Chen H, Wei B, Xiang M, Hu Z, Peng Z, Lin H, Sun J. Clindamycin Administration Increases the Incidence of Collagen-Induced Arthritis in Mice Through the Prolonged Impact of Gut Immunity. *Inflammation* 2018; 41(5):1900–11. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0833-4>
  115. Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K et al. Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis and rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2016; 68(11):2646–61. <https://doi.org/10.1002/art.39783>
  116. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied of Environmental Microbiology* 2000; 66(4):1654–61. <https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1654-1661.2000>
  117. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 217(2):133–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x>
  118. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2006; 40(3):235–43. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>
  119. Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, Young VB. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of Clostridium difficile Infection. *Gut Microbes* 2014; 2(3):145–58. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16333>
-

**IX. TABELLENVERZEICHNIS**

---

Tabelle 1: Übersicht über die Menge der eingefrorenen Bakterienkulturen.....	13
Tabelle 2: Herstellung der Antibiotikastammlösungen .....	14
Tabelle 3: Übersicht der im Experiment verwendeten Antibiotika im Trinkwasser .....	15
Tabelle 4: Übersicht der Versuchsabbruchkriterien anhand des Belastungsscores .....	17
Tabelle 5: Übersicht der Punktwerte zum Scoring der kollagen-induzierten Arthritis.....	21
Tabelle 6: Übersicht der verschiedenen Pathogenitätsmerkmale der verwendeten Clostridienstämme (91,97,98).....	27
Tabelle 7: Statistische Analyse des Gewichtsverlaufs von Tag 7 auf Tag 9.....	30
Tabelle 8: Nachweis von <i>C. difficile</i> -Toxin-Gen A aus Stuhl-DNA mittels PCR .....	34

## X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Durchführung der Bakterienapplikation mittels Schlundsonde.....	15
Abbildung 2:	Durchführung der Immunisierung.....	20
Abbildung 3:	Zeitlicher Ablauf und Interventionen in einzelnen Versuchsgruppen im ersten Versuchsteil .....	28
Abbildung 4:	DBA/1J × B10.Q F1-Mäuse sind anfällig für eine Infektion mit <i>C. difficile</i> , wobei der Gewichtsverlust mit der Pathogenität der <i>C. difficile</i> Stämme korreliert.....	29
Abbildung 5:	Vergleichbare IgG Serumantikörper gegen <i>C.difficile</i> Toxin A.....	31
Abbildung 6:	Alle mit VPI 10463 infizierten Mäuse zeigen positives Ergebnis im RidaQuick Toxin Assay.....	32
Abbildung 7:	Darstellung einer exemplarischen qualitativen <i>C. difficile</i> Toxin A Gen PCR aus eluierter Mäusestuhl-DNA mittels UV-Visualisierung der Banden. ....	33
Abbildung 8:	Eine Infektion mit dem Clostridienstamm VPI 10463 führt zu einer histologisch sichtbaren ulzerativen Enteritis.....	35
Abbildung 9:	Zeitlicher Ablauf und Einteilung der Mäusegruppen im zweiten Versuchsteil. ....	36
Abbildung 10:	Deutliche makroskopische Zeichen einer Arthritis nach Induktion der CIA.....	37
Abbildung 11:	Infektion mit <i>C. difficile</i> VPI 10463 reduziert die Inzidenz von kollagen-induzierter Arthritis stark, wohingegen die alleinige Antibiotikavorbereitung zu einer Verstärkung führt. ....	38
Abbildung 12:	Höchste Arthritiscores am Versuchsende in sham- und CIA-Gruppe, sehr niedriger Score in mit <i>C. difficile</i> infizierter Gruppe.....	39
Abbildung 13:	<i>C. difficile</i> beschleunigt die Rückkehr zum ursprünglichen Mikrobiom nach Antibiotikabehandlung.....	41
Abbildung 14:	Ähnliche Serumantikörpertiter gegen <i>C. difficile</i> Toxin A, wobei CDI+CIA erhöhte Antikörper gegen Toxin B im Hauptversuch zeigt.....	42
Abbildung 15:	Immunisierte Versuchstiere zeigten vergleichbare Serumantikörper gegen bovines und murines Kollagen II . ....	44
Abbildung 16:	Alle Versuchsgruppen wiesen am Ende der Experimente ähnliche Zytokinspiegel auf.....	45

---

**XI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**


---

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
ACPA	citrullinierte Peptidantigene ( <i>engl.</i> : anti-citrullinated peptid antigene)
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>engl.</i> : analysis of variance)
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
BI17	Clostridienstamm
BMI	Body-Mass-Index
Bp	Basenpaare
C57/BL6	Mausstamm ( <i>engl.</i> : Black 6)
CCNA	Zellzytotoxizitätsneutralisationstest ( <i>engl.</i> : Cell Cytotoxicity Neutralization Assay)
CDI	Infektion mit <i>Clostridioides difficile</i>
CDI+CIA	Versuchsgruppe
CFA	komplettes Freund-Adjuvans ( <i>engl.</i> : complete freund's adjuvant)
CIA	kollagen-induzierte Arthritis ( <i>engl.</i> : collagen induced arthritis)
DMARDs	Spezielle Rheumatherapeutika ( <i>engl.</i> : disease modifying anti rheumatic drugs)
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.</i> : desoxyribonuclein acid)
DPBS	Dulbeccos buffered saline
ELISA	Enzymo linke immunosorbent assay
EULER	Klassifikationskriterien für Diagnosestellung bei rheumatoider Arthritis
F1 (DBA/1J x B.10Q)	F1 Generation mit je einem Elterntier des DBA/1J- und B10.Q-Stammes
FMT	Fäkale Mikrobiotika Transplantation
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm
h	Stunde
H&E	Histologische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin
HLA	Histokompatibilitätsantigen ( <i>engl.</i> : Human Leukocyte Antigene)
IFA	inkomplettes Freund's-Adjuvans ( <i>engl.</i> : Incomplete Freund's adjuvant)

---



---

IFN	Interferon
IgG	Immunglobuline G
IL	Interleukin
2K14	Clostridienstamm
KBE	Koloniebildende Einheiten
l	Liter
Log	logarithmische phase
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MTX	Methotrexat
N <sub>2</sub>	Stickstoff
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert ( <i>engl.</i> probability)
PAD	Peptidylarginindeiminase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>engl.</i> Phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PZN	Pharmazentralnummer
RA	Rheumatoide Arthritis
REF	Artikelnummer als Referenz
rpm	Drehzahl ( <i>engl.</i> revolutions per minute)
SFB	Segmentierte filamentöse bakterien
SCFA	kurzkettige Fettsäuren ( <i>engl.</i> Short chain fatty acids)
Sham	Scheinbehandlung von Tieren, dienen als Kontrolle
SKG	Mausstamm, nach dem Entdecker benannt
SPF	Spezielle Haltungsbedingungen ( <i>engl.</i> specific pathogen free)
TC	Toxigene Kultur ( <i>engl.</i> Toxigene culture)
TcdA/B	Toxin A/B ( <i>engl.</i> Toxoid A/B)
Th17	Spezielle T-Helferzellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T-Zellen

---

---

VPI 10463	Clostridienstamm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

---

**XII. THESEN**

---

1. DBA1/B10.Q F1 Mäuse sind anfällig für eine Infektion mit *Clostridioides difficile*.
2. Verabreichung von  $10^5$  KBE *C. difficile* VPI 10463 führt zu Durchfall, Gewichtsverlust und einer histologisch nachweisbaren Entzündung im Darm.
3. Verabreichung von  $10^5$  KBE *C. difficile* 630, BI17 und 2K14 führt zu keinem signifikanten Gewichtsverlust.
4. Eine *C. difficile* Infektion schwächt die Inzidenz und Schwere einer kollagen-induzierten Arthritis stark ab.
5. Eine alleinige Antibiotikavorbehandlung führt zu einer Verstärkung der Inzidenz und Schwere einer kollagen-induzierten Arthritis.
6. Die Bildung und Höhe der Antikörper gegen Kollagen Typ II bei immunisierten Mäusen ist unabhängig von einer vorherigen Infektion mit *C. difficile*.
7. Die Bildung von Antikörpern gegen *C. difficile* Toxine A und B ist unabhängig von der Pathogenität der verwendeten Clostridienstämme.
8. Die Infektion mit *C. difficile* nach einer Antibiotikavorbehandlung führt zu einer schnelleren Rückkehr zum ursprünglichen Mikrobiom.
9. Eine Breitbandantibiotikabehandlung ohne nachfolgende CDI führt zu einem längeren und vermehrten Verbleiben von Enterokokken im Mikrobiom.

**XIII. EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Berlin, den 30.11.2020

Katharina Wenndorf

---

**XIV. LEBENS LAUF**


---

**Persönliche Daten**


---

Name	Katharina Siglinde Franziska Wenndorf, geb. Zollner
Geburtsdatum und -ort	01.02.1992, Würzburg
Adresse	Siegfriedstraße 212, 10365 Berlin
E-Mail	katharina.wenndorf@gmail.com
Nationalität	deutsch

**Bildungsweg**


---

09/02 - 05/11	Gymnasium Veitshöchheim, Abitur
05/12 - 04/13	Ausbildung zur Rettungsassistentin, Medakademie Berlin
04/13 - 03/15	Studium der Humanmedizin, Universität Erlangen, vorklinischer Abschnitt
04/15 - 12/20	Studium der Humanmedizin, Universität Rostock, klinischer Abschnitt
03/15	Erster Abschnitt ärztliche Prüfung
10/18	Zweiter Abschnitt ärztliche Prüfung
11/20	Dritter Abschnitt ärztliche Prüfung

**Promotion**


---

seit 02/2016	„Einfluss einer antibiotikaassoziierten <i>Clostridioides difficile</i> Infektion auf die kollagen-induzierte Arthritis“, experimentelle Arbeit, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Immunologie, AG Klinische Immunologie, Prof. Dr. B. Müller-Hilke, MME
--------------	--

**Praktisches Jahr**


---

11/19 - 03/20	Abt. für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Chefarzt Dr. med. U. Liebeskind Abt. für Orthopädie und Unfallchirurgie, Chefarzt: Dr. med. W. Vogler Abteilung für Gefäßchirurgie, Chefarzt: PD Dr. med. R.-I. Rückert ev. Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge
03/20 - 07/20	Abteilung für Innere Medizin I und II, ev. Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge, Chefärzte: PD Dr.med. W. Heise, Dr.med. J. Theil
07/20 - 10/20	Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, ev. Krankenhaus Königin Elisabeth Herzberge, Chefarzt: Dr. med. M. Lang

**Berufliche Erfahrung**


---

09/11 - 02/11	Freiwilliges Soziales Jahr, anästhesiologische IMC, Helios Krankenhaus Berlin-Buch, DRK
10/13 - 04/15	Studentische Pflegekraft, Station D03, Nephrologie/Hypertensiologie, Universitätsklinikum Erlangen
10/16 - 11/16	Studentische Hilfskraft/Hakenhalter, Abteilung für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie, Klinikum Südstadt, Rostock
06/15 - 09/18	Pflegespringer Rettungsstelle, Vivantes Klinikum am Urban, Berlin
09/17 - 09/18	Studentische Hilfskraft, Dermatologie, Universitätsklinikum Rostock

---

## Publikationen

---

Schmidt CJ\*, **Wenndorf K\***, Ebbers M, Volzke J, Müller M, Strübing J et al. Infection With Clostridioides difficile Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. Frontiers in Immunology 2020; 11:571049.

\*Erstautorenschaft

K. Wenndorf  
Berlin, den 30.11.2020

## **XV. DANKSAGUNG**

---

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank den nachfolgenden Personen entgegenbringen:

Mein besonderer Dank gilt Frau Professorin Dr. rer. nat. B. Müller-Hilke, MME die mir die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser Thematik gegeben hat, wodurch ich sehr viel in Bezug auf das wissenschaftliche und experimentelle Arbeiten lernen durfte. Vielen Dank für die Begleitung und Unterstützung auf diesem Weg.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. K. Kriebel und J. Fischer für die Hilfe und gute Zusammenarbeit.

M. Dettmer, Dr. S. Kneitz und J. Bull möchte ich für den technischen Support danken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. R. Engelmann, Dr. M. Ebbers, P. Lübke und J. Volzke für die Unterstützung und Antworten auf viele Fragen und besonders bei A. Buschhart, die immer ein offenes Ohr hatte.

Abschließend möchte ich ganz besonders meinem Mann, meinen Töchtern, meinen Eltern und Geschwistern danken, die mir stets eine Stütze sind und immer an mich glauben.